ELSA MARIA MATERON VÁSQUEZ

SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA O FÁRMACO CISPLATINA COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NO MONITORAMENTO CLINICO, METABÓLICO E AMBIENTAL

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra Maria Del Pilar T. Sotomayor

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Materón Vásquez, Elsa María
M425s Sensores eletroquímicos para o fármaco cisplatina como ferramenta biotecnológica no monitoramento clínico, metabólico e ambiental / Elsa María Materón Vásquez. – Araraquara : [s.n], 2015
129 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: María del Pilar Taboada Sotomayor

1. Quimioterapia. 2. Cisplatina. 3. Nanotubos de carbono. 4. Eletroquímica. 5. Biossensores. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ELSA MARIA MATERON VASQUEZ

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 10 de setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Profª. Drª. MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Prof. Dr. ASSIS VICENTE BENEDETTI
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Profª. Drª. REGINA MASSAKO TAKEUCHI
Faculdade de Ciências Integradas de Pontal / UFU / Ituiutaba - MG

Profª. Drª. KARÍN YANET CHUMBIMUNI TORRES
University of Central Florida / UCF / Orlando - EUA

CURRICULUM VITAE

Dados curriculares

Nome: Elsa Maria Materon

Nome em citações bibliográficas: Elsa María Materón, Materón E.M. Elsa M. Materón.

Naturalidade: Santiago de Cali, Colômbia

Nacionalidade: Colômbia

Formação acadêmica

Graduação: Graduação em Química**.** Universidade *Del Valle*, realizado no Departamento de física de estado sólido e matéria condensada. Tendo como orientador Prof. Dr. Jesús Evelio Diosa Astaiza e Prof. Dr. Rubén Antonio Vargas Zapata.

Período: 08/2000 a 08/2006

Titulo do projeto: Estudio de las transiciones de fase del sistema $(1\text{-}x)NH_4H_2PO_4\text{-}x\text{-}Al_2O_3$

Pós-Graduação

-Mestrado em Biotecnologia, realizado no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno.

Período: 08/2009 a 08/2011

Título do Projeto**:** Obtenção de micro/nanoparticulas poliméricas para o encapsulamento do fármaco bromidrato de galantamina.

Período:

-Doutorado em Biotecnologia realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientadora Profª Dra Maria D.P.T. Sotomayor.

Título do Projeto**:** Sensores eletroquímicos para o fármaco cisplatina como ferramenta biotecnológica no monitoramento clinico, metabólico e ambiental

Período: 08/2011 a 08/2015

Formação acadêmica complementar

- **07/2011** Controlled Release Technology: Polymeric Delivery Systems for Pharmaceuticals, Proteins, and other Agents. Massachusetts Institute of Technology (MIT). Boston, USA.

- **02/2013- 08/2013:** Estágio de Doutorado, University of Waterloo, Waterloo, Canada.
  Titulo: Aptasensor eletroquímico para monitoramento de fármacos antitumorais no tratamento de quimioterapia.
  Orientador: Prof.Dr. Juewen Liu
  Bolsa: the Emerging Leaders of the Americas Program (ELAP).

- **01/2015- 04/2015:** Estágio de Doutorado, University of Pennsylvania, Pennsylvania, USA.
  Titulo: Fabricação de híbridos nano/bio transistores de efeito de campo baseados em grafeno para detecção de biomarcadores de câncer.
  Orientador: Prof. Dr. A. T. Charles Johnson

Participação em eventos científicos com apresentação de trabalhos

- Materón, E. M. *et al.* Development of glutathione-se-transferase based biosensor for detection of tartrazine in food. XX SIBEE, Uberlândia-MG **(Pôster).**
- Materón, E. M. et al. Multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrodes for cisplatin detection. 227th Meeting ECS. Chicago, Illinois, 2015 **(Pôster)**.
- Materón, E.M. *et al*. "Eletrodos modificados com Glutationa-s-transferase para monitoramento de anticancerígenos"**. La Serena- Chile (Oral),** 2014.
- Materon, E.; Wong, A.; Cilli, E.M.; Sotomayor, M.D.P.T. "Biossensor à base de pasta de carbono modificada com GTS para quantificação de cisplatina". XIX SIBEE, Campos de Jordão. **Brasil. (Pôster),** 2013.

Artigos publicados

- Materón, E.M.; Wong, A.; Klein, S.; Liu, J.; Sotomayor, M.D.P.T., Multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrodes for cisplatin detection, Electrochimica Acta 158 (2015) 271–276.
- Wong, A.; Materón, E.M.; Sotomayor, M.D.P.T. Development of a biomimetic sensor modified with hemin and graphene oxide for monitoring of carbofuran in food, Electrochimica Acta 146 (2014) 830-837.
- Materon, E.M.; Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs, Biosensors and Bioelectronics 7 (2014) 232-236.

- Hui Jiang, Elsa M. Materon, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Juewen Liu. “Fast assembly of non-thiolated DNA on gold surface at lower pH”. Journal of Colloid and Interface Science 411 (2013) 92–97.

- Vargas, R. A.; Castillo J. H.; Castillo, J. R.; Materón, E.M. Electrical relaxation in proton conductor composites base don $(NH_4)H_2PO_4/TiO_2$. Venezuela. Revista latino-americana de metalurgia y materiales.2009. vol51, fasc:2.

- Materón, E. M. Castillo, J.; Castillo, R.; Vargas, R. “Estudio de las transiciones de fase de el sistema $(1-x)NH_4H_2PO_4$-x-$ZrO_{2,}$ Revista Colombiana de Física, vol. 40, No. 1, Marzo 2008

- Castillo, J.; Materón, E.M.; Castillo, R.; Vargas, R.; Bueno, P.R.; Varela, J. A. et al, “Electrical relaxation in proton conductor composites based on $(NH_4)H_2PO_4/TiO_2$” Ionics Magazine.24 decembre 2008.

- Materón, E. M.; Vargas, R.; Ramirez, A.; Diosa, J. E. "*Estudio de las transiciones de fase del sistema $(1-x)NH_4H_2PO_4$-$(x)Fe_2O_3$".* Revista Colombiana de Física. , Vol.39, n.2, 2007.

- Materón, E. M.; Castillo, J.; Castillo, R.; Vargas, R. “Estudio de las transiciones de fase del sistema $(1-x)NH_4H_2PO_4$-x-$Al_2O_{3,}$ REVISTA COLOMBIANA DE FÍSICA, VOL. 38, No. 3. 2006 .

DEDICATÓRIA

A Jeová pela força e por guiar-me no caminho correto,

A minha mãe por sempre estar disposta apoiar-me,

A meu pai (em memória), seus ensinamentos viverão para sempre em mim.

A Ademar Wong que sempre esteve ao meu lado, sempre me ajudando

A Selisa Rollins, Lorena e Maria Luisa Candela.

A meu eterno amigo e orientador de graduação Prof. Dr. Ruben A. Vargas,

A Prof. Dr. Nelson Ramos, Prof. Dr. Juewen Liu, Profa. Dra. Hideko Yamanaka e Profa. Dra. Valnice Boldrin, pela paciência, apoio, atenções e disposição para responder com minhas dúvidas.

A todos que me deram forças nesta etapa de minha vida.

O professor se liga à
eternidade. Ele nunca sabe quando cessa a sua influência

Henry Adams

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Pilar Taboada por ter me aceitado no grupo de eletroquímica, além disso, agradeço-a por vincular-se na Biotecnologia, permitindo que minhas ideias fossem realizadas nessa tese.

A meu orientador em Canadá, Prof. Dr. Juewen Liu, que confiou em meus conhecimentos e foi um apoio muito grande na elaboração desta tese e em minha vida. Além de dar-me muitas ferramentas para melhorar minha vida acadêmica. Sempre estarão em minha mente suas palavras e seu jeito tranquilo de resolver todo com um sorriso. Também a seu grupo de pesquisa Jimmy Huang, Feng Wang, Alexander Ip, Shine e Biwu, que foram muito amigáveis, me aconselharam, minhas tristezas me escutaram e me ensinaram a linda cultura chinesa.

A meu orientador na universidade de Pensilvânia, Prof. Dr. Charles Johnson, junto a seu grupo Carl, Nick, Gao Zhaoli, Jinglei Ping, e Ramya, e especialmente Madeline Diaz, me ensinaram como a ciência pode ser divertida e louca. Eternamente agradecida à Madeline pela amizade, ensinamentos e o carinho, pois por mais que as temperaturas tenham chegado a -15 ^{o}C, sua amizade me encorajava a trabalhar mais fortemente e perseguir o conhecimento.

À Profa.Dra. Hideko Yamanaka, Prof. Dr. Nelson Ramos, Profa. Dra. Maria Valnice, Prof. Dr. Stanlei Klein, Prof. Dr.. Reinaldo Marchetto pela contribuição através de discussões, pelo tempo, apoio e seus exemplos que me deram animo para continuar a luta.

A meus amigos, Bárbara pela companhia e amizade, Angela pela eterna amizade de já 15 anos. Muito obrigada à Maria Luisa Candela pelo apoio e por ser uma mãe apesar da distância, minha irmã amiga Selisa Rollins pela amizade, apoio, cuidados e suas viagens desde Arizona ao Brasil para acompanhar-me quando ficava sozinha, Lorena minha irmã e amiga pelo apoio, ao Ademar Wong que sempre esteve ao meu lado sendo um suporte, pelas risadas, companhia nos momentos mais ruins e os bons, por corrigir o português, pelos ensinos da vida e acadêmica, minha mãe Nubia que sempre

é uma mãe maravilhosa cuidando-me e apoiando-me em tudo, todos vocês são muito valiosos para mim e são minha família.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos colegas de grupo de eletroanalítica pela convivência

A todos os funcionários da seção de pós-graduação especialmente Wennia pela paciência e ajuda muito importante que proporciona aos estudantes.

RESUMO

Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de dois sensores eletroquímicos modificados para determinação sensível e seletiva de cisplatina, um dos fármacos mais frequentemente utilizados no tratamento oncológico de diversos tipos de patologias tumorais cancerosas. O primeiro sensor foi desenvolvido a base de pasta de carbono modificado com a enzima glutationa-s-transferase (GST). O biossensor é baseado na resposta inibitória da atividade enzimática da enzima GST devido à adição do fármaco cisplatina. Glutationa reduzida (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno foram utilizados como substratos para a enzima GST, os quais foram adicionados na concentração de 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} na cela de medida. As técnicas utilizadas para a caracterização do sistema foram espectroscopia de infravermelho, voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Os resultados quantitativos daquelas interações foram obtidos usando VOQ, observando-se uma resposta linear entre 50 e 140 µmol L^{-1} de cisplatina e limite de detecção de 8,8 µmol L^{-1} de cisplatina. O biossensor apresentou uma boa repetibilidade intra-dia com um desvio padrão relativo de 4,2% avaliando quatro curvas analíticas. O uso da pasta de carbono ofereceu a possibilidade de uma simples, rápida e eficiente renovação da camada de superfície do eletrodo, o que permitiu a utilização da mesma pasta em várias medidas durante um longo período de tempo.

Adicionalmente, foi desenvolvido um sensor não enzimático no monitoramento da cisplatina usando eletrodos impressos de carbono (SPCE, screen-printed carbon electrodes) modificados com nanotubos de carbono de multiplas paredes funcionalizados com grupos carboxila (MWCNT-COOH.SPCE) da DROPSENS® (SDS 110CNT). Com o propósito de avaliar a influência dos nanotubos de carbono na resposta do sensor de cisplatina foi utilisada a técnica de voltametria cíclica. O uso do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) permitiu a determinação satisfatória da cisplatina por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica. As análises com o MWCNT-COOH/SDS /SPCE ocorreram em potencial de -0,25 V *vs* Ag/AgCl (KCl_{sat}) e cloreto de sódio 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0 permitiram, nas condições otimizadas de análise, a obtenção de uma faixa de resposta entre 1,45 x 10^{-5}

e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} com um ajuste linear de R = 0,9974, uma sensibilidade de 4,5 x 10^{4} (±1,0x10^{3}) μA mol L^{-1}, com limites de detecção e quantificação de 4,6 x 10^{-6} e 1,4 x 10^{-5} mol L^{-1}, respectivamente. A reprodutibilidade na resposta do sensor foi avaliada através da análise de três replicatas, obtendo-se o valor de desvio padrão relativo de 3,91%, demonstrando que o sensor tem alta estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade na determinação da cisplatina. A seletividade do sensor foi avaliada a partir da análise de outros complexos metalo-organicos de platina, como carboplatina e oxaliplatina e componentes organicos como doxorrubicina e gemcitabine, todos eles empregados na terapia antitumoral. Os resultados obtidos mostraram ausência de resposta eletroquimica para aqueles fármacos, e maior resposta eletroquímica para cisplatina. Quando aplicado em amostras de soro sanguíneo enriquecidas com cisplatina, os resultados obtidos na recuperação de cada amostra foram compatíveis com o metodo comparativo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Palavras chaves: Eletroquímica, biossensores, sensor, quimioterapia, cisplatina.

ABSTRACT

This thesis presents the development of two electrochemical sensors for the sensitive and selective detection of cisplatin, one of the drugs most frequently used in the oncologic treatment of several cancer tumor pathologies. The first was a biosensor based on carbon paste modified with the enzyme glutathione-s-transferase (GST). The biosensing was based on the inhibitory response of the enzymatic activity of GST due to the addition of the drug cisplatin. Reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene were used as substrates for the GST enzyme, and were added at the concentration of 1.0×10^{-3} mol L^{-1} in the measuring cell. The techniques used for the characterization of the system were infrared spectroscopy, cyclic voltammetry and electrochemical impedance. The quantitative results of those interactions, obtained by square wave voltammetry (SWV) and differential pulse with adsorptive stripping voltammetry were very similar, and very promising for the analysis of cisplatin. The biosensor showed, using SWV, a linear response between 50 and 140 μmol L^{-1} of cisplatin. The detection limit was 8.8 μmol L^{-1} of cisplatin. In the intra-day repeatability studies, the relative standard deviation was 4.2%, from the analysis of four analytical curves, showing the repetitiveness of the electrochemical response of the proposed sensor. The use of the carbon paste offered the possibility of the simple, quick and efficient renewal of the surface layer of the electrode, which allowed the use of the same paste for several measurements during a long period of time.

Additionally, a non-enzymatic sensor was developed for the monitoring of cisplatin using screen-printed carbon electrodes (SPCE, screen-printed carbon electrodes), functionalized with multi-walled carbon nanotubes and factory modified with carboxyl groups (MWCNT-COOH) acquired from DROPSENS® (SDS 110CNT). The electrochemical characterization of the screen printed sensor in the presence of cisplatin was done by cyclic voltammetry technique, in order to evaluate the influence of carbon nanotubes on the sensor response. The MWCNT-COOH / SPCE has shown on

many occasions an unstable response in the detection of cisplatin using a sodium chloride supporting electrolyte. Such a condition has been solved with the use of various surfactants, among which sodium dodecyl sulfate (SDS) showed the best results in electrochemical measurements. This enabled the satisfactory determination of cisplatin by differential pulse voltammetry with anodic stripping voltammetry. Analysis with the MWCNT-COOH/SDS /SPCE occurred at potential of -0,25 V vs Ag/AgCl (KClsat) and using sodium chloride supporting electrolyte 0,1 mol L^{-1} in pH 7.0. It allowed the analysis conditions are optimized to obtain a response range between 1,45 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} with a linear adjustment R = 0,9974, sensitivity of 4,5 x 10^{4} (±1,0x10^{3}) µA mol L^{-1}, with limits of detection and quantification of 4,6 x 10^{-6} e 1,4 x 10^{-5} mol L^{-1}, respectively. The reproducibility of the sensor response evaluated by the analysis of three replicates, shown a RSD of 3.91%, indicating that the biosensor has high stability, repeatability and reproducibility in determining the cisplatin. The selectivity of the sensor was evaluated from the analysis of other metallo-organic platinum complexes such as carboplatin and oxaliplatin and organic components such as doxorubicin and gemcitabine, all these used in antitumor therapy. The results showed no electrochemical response of some drugs and greater electrochemical response to cisplatin, which was due to the greater interaction with the surfactant (SDS). When applied to blood serum samples spiked with cisplatin, results in the recovery of each sample were satisfactory and were compatible with the comparative method (HPLC).

Keywords: Electrochemistry, biosensors, sensor, chemotherapy, cisplatin.

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1: Gráfico resumido da história da quimioterapia 5
Figura 2: Ciclo de divisão celular 9
Figura 3: Apresenta como agem os fármacos antitumorais durante o ciclo de divisão celular 10
Figura 4: Ação dos fármacos antitumorais no DNA..... 14
Figura 5: Fármacos anticancerigenos expulsos pela P-pg..... 18
Figura 6: Estrutura química do substrato glutationa (GSH) 21
Figura 7: Mecanismo redox da célula envolvendo as enzimas GSTs e detoxificação da cisplatina 22
Figura 8: Resumo dos principais mecanismos considerados na resistência ao agente antitumorar cisplatina. (baseado em Cepeda Victoria et al, 2007) 23
Figura 9: Mecanismo de detoxificação do cisplatina 25
Figura 10: Mecanismo de hidrolises do fármaco cisplatina 36
Figura 11: (A) reação catalisada por GST entre GSH e CDNB, gerando um aduto de cor amarela. (B) absorbância a 340 nm Da reação entre CDNB e GSH na presença de diversas quantidades de GST. A reação foi realizada em tampão fosfato 0,05mol L^{-1}(pH 6,5) a 37º C. A linha de controle não contém GST (linha preta). (C) Otimização do pH para a reação catalisada de GST.(D) Perfil da inibição espectrofotométrica da reação enzimática na presença do fármaco cisplatina..... 45
Figura 12: (A) Voltamogramas cíclicos da pasta de carbono sem modificar (-GST) e modificada com GST (+GST). (B) Voltametria cíclica de pasta de carbono modificado com GST mostrando resposta do substrato e inibição da cisplatina em potencial entre -0,4 e 0,8 V. Medidas realizadas em eletrólito suporte de tampão fosfato salino 0,05 mol L^{-1} em NaCl 0,01 mol L^{-1} a velocidade de varredura de 0,1 Vs^{-1}..... 48
Figura 13: Apresenta voltamogramas cíclicos das reações da enzima GST com (A) CDNB + GSH (B) cisplatina + GSH (C) comparação entre ambas às reações e (D) Estudo de velocidade de varredura 51

Figura 14: Gráfico de fluorescência da afinidade de GST com dois substratos CDNB (reta laranja) e cisplatina (reta azul) 53
Figura 15: Variação da corrente de pico anódica com a velocidade e varredura e gráfico de Δi_{pa} *vs* $v^{1/2}$ (B). Condições de análise: [GSH],[CDNB] = 1 mmol L^{-1} e [Cisplatina] = 1 mmol L^{-1} , Fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,5) 54
Figura 16: Gráfico de Bode das pastas de carbono sem modificar, pasta de carbono modificada com glutaraldeído e biossensor, medidas realizadas em tampão fosfato 0,05mol L^{-1} a pH 6,5 55
Figura 17: Espectros de infravermelho da pasta de carbono não modificada, pasta de carbono modificada com glutaraldeído e biossensor (pasta modificada com a enzima GST e glutaraldeido) 56
Figura 18:Voltamogramas de onda quadrada obtidos na otimização do tempo de pré-concentração na resposta do biossensor 57
Figura 19:(A) Curva analítica obtida por VOQ em condições otimizadas: Solução tampão fosfato 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6,5) com concentrações crescentes de cisplatina. [GSH] = [CDNB] = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, [Cisplatina] em mol L^{-1}: a = 0; b= 5,0x10^{-5}; c= 6,5x10^{-5}; d= 7,9x10^{-5}; e= 9,0x10^{-5}; f= 1,0x10^{-4}; g=1,3x10^{-4}; h=2,5x10^{-4}; i=3,4x10^{-4}. (B) Quantificação da queda de corrente de pico em função da concentração de cisplatina.Frequencia 10 Hz , Amplitude 0,1 V , degrau de potencial 5 x10^{-3} V..... 58
Figura 20: Quantificação por inibição pela diminuição da corrente de pico em função da concentração de cisplatina (A) e curva analítica (B) obtida pela VDP em 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} de solução tampão de fosfato (pH 6,5), [GSH] = [CDNB] = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e com diferentes concentrações de cisplatina em mol L^{-1}: a = 0; b= 5,0x10^{-5}; c= 6,5x10^{-5}; d= 7,9x10^{-5}; e= 9,0x10^{-5}; f= 1,0x10^{-4} g=1,3x10^{-4}; h=2,5x10^{-4}. Amplitude 0.1 V, tempo de modulação 5 x 10^{-2} s, degrau de potencial 5 x10^{-3} V. Intervalo de tempo 0,2 s 60
Figura 21: Perfil da estabilidade do biossensor na presença de cisplatina 62
Figura 22: (A) Representação da reação do GSH e GST, na presença de cisplatina. Neste caso os fármacos usados como antitumorais competem com o CDNB pelos sítios ativos da enzima produzindo uma diminuição no sinal de corrente. (B) Estruturas dos fármacos usados na quimioterapia. (C) Mecanismo proposto para a resposta do biossensor 65

Figura 23: Resposta do biossensor para alguns possíveis compostos interferentes presentes no soro sanguineo 66
Figura 24: Resposta eletroquimica em voltametria cíclica da cisplatina em sensor impresso: (A) eletrodo não modificado, (B) modificado com MWCNT. Em diferentes ciclos de varredura de potencial 67
Figura 25: Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com MWCNT de uma solução contendo 0,1 mol L^{-1} de NaCl e 8,0x10^{-4} mol L^{-1} de SDS (NaCl/SDS) em ausência e presença de cisplatina..... 69
Figura 26: Voltamograma cíclico do eletrodo impresso na presença e ausência de SDS usando NaCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito de suporte. 70
Figura 27: Estudo do efeito do pH na resposta do sensor. Medidas realizadas em VPD usando 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0.8 V and t_{acc} = 50 s e [Cisplatina] = 2,0x10^{-3} mol L^{-1}) 71
Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial para a resposta à cisplatina do sensor proposto usando surfactante (A) CTAB, (B) Triton X e (c) SDS 72
Figura 29: Estrutura do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) 73
Figura 30: (A) Perfil de resposta do sensor para cisplatina usando DPV; (B) Curva análitica correspondente 75
Figura 31: Perfil de resposta em VPD obtida para diferentes compostos antitumorais. Medidas realizadas em 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0.8 V and t_{acc} = 50 s em NaCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) [Cisplatina] = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} 76
Figura 32: Mecanismo de hidrólise da carboplatina 77
Figura 33: Mecanismo de hidrólise da oxoplatina 78
Figura 34: Mecanismo da formação de micelas com a cisplatina 80
Figura 35: Esquema ilustrativo do funcionamento do sensor/SDS na presença de cisplatina 81
Figura 36: Determinação da cisplatina em amostras de soro, (A) usando o sensor proposto; (B) por cromatografia líquida de alta eficiência 82

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1: Comparação dos dados obtidos por voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. 61

Tabela 2: Resultados obtidos com o biossensor na análise dos fármacos antitumorais e metabolitos do sangue 63

Tabela 3: Parâmetros avaliados para o desenvolvimento do sensor 74

Tabela 4: Comparação do sensor com o método cromatográfico (HPLC) 84

Tabela 5: Comparação de alguns métodos de determinação de Cisplatina encontrados na literatura 84

LISTA DE ABREVIATURAS E DAS SIGLAS

A – ámperes

CAK- Quinase ativadora dependente de ciclina.

CDNB 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CKIs – Quinase inibidoras de Cdks.

C-Jun-- c-Jun N-terminal kinases (JNKs)

Cdks- Quinases dependentes de ciclinas.

C-MOPP: Acrônimo da mistura dos fármacos o qual substituiu a mostarda nitrogenada pela Ciclofosfamida. Prednisona, ProCarbazina

DPV – Voltametria de pulso diferencial

EA – Eletrodo auxiliar

ER – Eletrodo de referência

ERCC1- excision repair cross-complementation group 1

ET – Eletrodo de trabalho

FTIR – Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier

P-gp- glicoproteina P

GSH- Glutationa reduzida

GSSG- Glutationa oxidada

GST- Glutationa-s-transferase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

i - Corrente elétrica

NER- Reparo por excisão de base (Nucleotide Excision Repair)

MT- Metalotioneína

MMR-Reparo de pareamento errado (Mismatch Repair)

MOMP- Acrônimo da mistura dos fármacos MOstarda nitrogenada com vincristina, Metotrexato, Prednisone

MOPPC- Acrônimo da mistura dos fármacos MOstarda nitrogenada com vincristina, Prednisona, ProCarbazina

MWCNT – Nanotubo de carbono de parede múltipla

MWCNT/COOH/SPE- Eletrodo impresso modificado com nanotubos de carbono de paredes multiplex funcionalizado com grupo COOH

MIP – Polímero molecularmente impresso

RSD- desvio padrão relativo

SDS- dodecilsulfato de sódio

SPE- Eletrodo impresso

SPCE- Eletrodo impresso baseado em carbono

t - tempo

VAMP: Acrônimo da mistura dos produtos químicos Vincristina, Ametopterina, 6-Mercaptopurina, e Prednisona

VOQ – Voltametria onda quadrada

VPD - Voltammetria de pulso diferencial

VC – Voltametria cíclica

V - Volts

v- velocidade de varredura

μ - micro

GLOSSÁRIO

- **Agente que se intercala:** corante ou outro composto que contém um anel aromático ou outra estrutura plana que pode se encaixar entre duas bases sucessivas no DNA e pode causar mutação por inserção ou deleção
- **Anáfase:** Estágio da mitose no qual as cromátides pareadas separam-se e movem-se para as extremidades opostas do fuso.
- **Angiogênese:** formação de novos vasos sanguíneos ou seu desenvolvimento e crescimento a partir dos existentes.
- **Anóxia:** estado de privação de oxigênio.
- **Antagonista**: Agente que se liga a um receptor e inibe ligação do agonista específico para o receptor.
- **Apoptose:** Forma de morte celular na qual a célula encolhe e condensa, seu citoesqueleto colapsa, a membrana nuclear se desintegra, e o DNA é fragmentado. A membrana celular fica alterada e evoca rápida fagocitose sem perda de conteúdo celular no meio circundante ou indução de uma resposta inflamatória.
- **ATP- binding cassette** : Proteína cassete de ligação a ATP, transportadores ABC
- **Ciclina:** Proteína cuja concentração flutua durante o ciclo celular e que ativa uma proteína quinase dependente de ciclina, regulando assim a progressão pelo ciclo.
- **Fase G0:** estado de não divisão de uma célula que saiu do ciclo celular no ponto de restrição durante a fase G1.
- **Fase G1:** Fase do ciclo celular que consiste da parte da interfase em que ocorre crescimento antes de inicio da replicação do DNA.
- **Fase M:** Parte do ciclo celular na qual o núcleo e o citoplasma se dividem para formar duas células filhas.
- **Fase S:** Fase do ciclo celular no qual ocorre a replicação do DNA e do cromossomo ocorre.

- **Fuso mitótico:** rede de microtúbulos formados durante a divisão celular, no final da prófase, Irradia de um centríolo em cada pólo para os centrómeros dos cromossomos duplicados. Serve para reparar os cromossomos irmão.
- **Glicoproteína:** proteína conjugada que contém carboidrato covalente ligado.
- **Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA): LLA** é um câncer semelhante à leucemia mielóide aguda, mas que se origina de outro grupo de células, os precursores dos linfócitos. Em uma pessoa com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), os blastos não se desenvolvem normalmente em células brancas do sangue. As células anormais então ocupam espaço na medula normalmente dedicado à células saudáveis, e dificultam a criação de novas células. Este processo pode levar a uma redução nos glóbulos vermelhos e no desenvolvimento de anemia, bem como uma redução de células brancas do sangue que leva a um sistema imunológico mais fraco.
- **Leucemia Mielóide Aguda (LMA): LMA** é um câncer que se espalha rapidamente no sangue e medula óssea. Devido à origem das células leucêmicas, a medula óssea produz rapidamente um grande número de células, que na maioria das vezes não funcionam corretamente e substituem as células normais.
- **Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)**: é um tipo de câncer que começa nas células formadoras do sangue da medula óssea. Os pacientes com LMMC apresentam um elevado número de monócitos no sangue (pelo menos 1.000 por mm^3). Em alguns casos a contagem de monócitos é muito mais elevada, fazendo com que a contagem total de células brancas do sangue seja alta.
- **Linfoma de Burkitt** : (anteriormente denominado *Linfoma Não-Hodgkin de alto grau de pequenas células não-clivadas*) é uma neoplasia de células B maduras altamente agressiva que afeta principalmente a faixa etária mais baixa, sendo endemico nas regiões africanas.
- **Linfomas difusos de grandes células B (LDGCBs)**: é um tipo de câncer do sistema linfático que acomete principalmente gânglios em nosso organismo. Constitui um grupo heterogêneo dentro dos linfomas não Hodgkin.
- **Linfoma de Hodgkin:** é uma forma de câncer que se origina nos linfonodos (gânglios) do sistema linfático, um conjunto composto por órgãos, tecidos que

produzem células responsáveis pela imunidade e vasos que conduzem estas células através do corpo.

- **Linfoma de não-Hodgkin:** muito mais comuns, também são predominantemente derivados de linfócitos B, sendo que apenas cerca de 10% dos casos originam-se de linfócitos T ou NK. Ao contrário do linfoma de Hodgkin, os linfomas não Hodgkin não têm um tipo celular característico, apresentando expressiva heterogeneidade morfológica, imunofenotípica e genética. Estes tipos celulares são clonais, derivadas de um precursor linfoide comum que sofreu transformação neoplásica.
- **MAP Quinase** (Mitogen Activated Protein Kinases - Proteíno-**quinases** ativadas por mitógenos) é uma subfamília de **proteínas**-**quinase** específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular
- **Microtúbulo:** estrutura cilíndrica longa oca (25 nm de diâmetro) do citoesqueleto. É composto de tubulina e está presente em cílios, flagelos, centríolos e fibras do fuso.
- **Mitógeno:** proteína (p. ex., fator de crescimento derivado de plaquetas) que estimula divisão celular primariamente atuando no ponto de restrição do ciclo celular.
- **P53:** Proteína regulatória de genes (53 kDa) que é ativada por lesão no DNA e envolvida no controle do ciclo celular, apoptoses e na manutenção da estabilidade genética. Está mutada em cerca de metade dos cânceres humanos.
- **Pareamento de bases:** formação de um número máximo de ligações de hidrogênio entre um par de bases complementares (uma purina e uma pirimidina) em duas fitas de um ácido nucleico ou em fita dobrada sobre si mesma.
- **Ponto de restrição:** tempo durante a fase G1 do ciclo celular quando uma célula prossegue para a fase S ou sai para a fase G0.
- **Proto-oncogenes**: Um **proto-oncogene** é um gene normal que se torna um oncogene devido a uma mutação ou ao aumento de expressão gênica. As proteínas resultantes podem ser denominadas "oncoproteínas". Os proto-oncogenes codificam proteínas que ajudam a regular o crescimento e a diferenciação celular.
- **Quinase ciclina dependente (cdk):** proteína quinase cuja atividade é modulada pela concentração de uma ciclina.

- **Reação fase I:** reação metabólica em biotransformação que introduz ou expoê grupos funcionais, tornando o produto mais hidrossolúvel. (ex. oxidação, redução e hidrólise).
- **Reação de fase II:** reação metabólica, (ex. acilação, sulfatação, conjugação) que geralmente segue uma reação de fase I na biotransformação e inativa o produto e o torna hidrossolúvel para excreção.
- **Reparo de pareamento errado (mismatch): (MMR)** reparo enzimático de uma fita de DNA que contém uma base que não pode parear corretamente com a da fita complementar.
- **Reparo por excisão de base:** correção de uma base anormal em uma fita de DNA por remoção dessa base por uma DNA glicosilase, remoção da unidade desoxirribosefosfato e possivelmente nucleotídeos vizinhos por uma endonuclease AP e prenchemento da falha por DNA polimerase e DNA ligase.
- **Reparo por excisão de nucleotídeo: (NER)** Correção de uma lesão que distorce a estrutura helicoidal de uma fita de DNA por remoção do segmento anormal por uma excinuclease e preenchimento da falha por DNA polimerase e DNA ligase.
- **Rabdomiossarcoma embrionário**: este rabdomiossarcoma é o mais comum e tende a se desenvolver na área de cabeça e pescoço, bexiga, vagina e na próstata e testículos ou em seu redor. As células do rabdomiossarcoma embrionário se assemelham às células pré-musculares de fetos de 6 a 8 semanas. Duas variantes de rabdomiossarcoma embrionário, o rabdomiossarcoma botrióide e o rabdomiossarcoma de células fusiformes, tendem a ter um prognóstico melhor do que a forma mais comum da doença.
- **Retinoblastoma**: O retinoblastoma é um tumor maligno originário da membrana neuroectodérmica da retina embrionária, compreendendo de 2 a 4 % dos tumores malignos pediátricos, sendo assim, o tumor maligno ocular mais frequente da infância.
- **Sarcomas**: São tumores que se desenvolvem no corpo que tem origem principalmente em células que fornecem sustentação, como células dos ossos, células de gordura, células que constituem nossos vasos sanguíneos, músculos, cartilagens, pleuras, meninges e inúmeras outros tipos de células.

- **Tumor ascitico de Ehrlich** : Tumor de Ehrlich foi introduzido por Ehrlich em 1986 e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais.
- **Tumor de Wilms:** O tumor de Wilms é o tumor renal maligno mais frequente em crianças. A faixa etária de aparecimento é entre 2 a 4 anos. Frequentemente o tumor aparece apenas em um rim. Em cerca de 5% dos casos pode haver tumor bilateral, comprometendo os dois rins.
- **Walker 256**: O carcinossarcoma 256 de Walker, descoberto por Walker em 1928 a partir de um adenocarcinoma de mama em rata, é mantido em vários laboratórios, por sucessivas inoculações. É um dos poucos modelos de tumores, disponíveis para estudos experimentais nas áreas médicas e biológicas em diferentes linhas de pesquisa. Esse tumor tem a vantagem de ser facilmente obtido "*in vivo*" pela inoculação de células em ratos, desenvolve-se rapidamente e falhas de inoculação e regressão espontânea são pouco freqüentes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 HISTÓRIA DA QUIMIOTERAPIA 1

1.2 COMO AGE A QUIMIOTERAPIA 8
1.2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES CITOTOXICOS 11
1.3 USOS CLÍNICOS DA QUIMIOTERAPIA 16
1.3.1 EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA 17
1.3.2 RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTITUMORAIS 17
1.3.2.1 CAUSAS DA RESISTÊNCIA A ANTITUMORAIS 18
1.3.3 RESISTÊNCIA À CISPLATINA 24
1.3.3.1 FUNÇÂO DA GSH NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA 25
1.3.4 A IMPORTÂNCIA DA ELETROQUÍMICA NA QUIMIOTERAPIA 28
1.3.4.1 SENSORES E BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS 30
1.3.4.2 ELETROQUÍMICA NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS 33
1.3.4.3 ***ELETROQUÍMICA NO ESTUDO DE INTERAÇÕES COM FÁRMACOS QUIMIOTERÁPICOS*** 35
1.3.4.4. MONITORAMENTO DE FÁRMACOS ANTITUMORAIS EM CULTIVOS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS 36
1.3.4.5. ***QUÍMICA E ELETROQUÍMICA DA CISPLATINA E SEUS ANÁLOGOS*** 37
2 OBJETIVO 41
3 PARTE EXPERIMENTAL 42
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES 42
3.2 PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA 42
3.3 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS 43
3.3.1 BIOSSENSOR 43
3.3.2 SENSOR IMPRESSO 44
3.4 MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS 45
3.8. ESTUDO DA SELETIVIDADE DO BIOSSENSOR 46
3.9. APLICAÇÃO DO SENSOR IMPRESSO UTILIZANDO AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO 46
3.10. ANÁLISE EM HPLC DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO 47
4 RESULTADOS E DISCUSÃO 47
4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE CISPLATINA BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DA GST EM PASTA DE CARBONO . 47
4.1.1 ESTUDOS PRELIMINARES EM ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS 47

4.1.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR Á BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM GST NA PRESENÇA DE CISPLATINA .. 51

4.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE CISPLATINA NO BIOSSENSOR PROPOSTO POR TECNICAS VOLTAMÉTRICAS DE PULSO. ..... .57

4.1.4 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE ESTABILIDADE E SELETIVIDADE DO BIOSSENSOR 67

4.1.5 ESTUDO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR FRENTE À ALGUNS MÉTABOLITOS PRESENTES NA SANGUE 71

***4.2 ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO MODIFICADO COM MWCNT NA DETECÇÃO DA CISPLATINA** 73*

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO SENSOR 73

4.2.2. INFLUÊNCIA DO ELETROLITO SUPORTE E pH NO SENSOR MWCNT-COOH/SDS/SPE 76

4.2.3. OTIMIZAÇÃO DO SURFACTANTE UTILIZADO 77

4.2.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO À BASE DE MWCNT-COOH/SDS/SPE 80

4.2.5 MECANISMO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DA CISPLATINA 86

4.2.6. APLICAÇÃO DO SENSOR EM AMOSTRAS DE SORO BIOLÓGICO 89

5. CONCLUSÕES 93

REFERENCIAS..... **Erro! Indicador não definido.**

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA QUIMIOTERAPIA

O câncer é definido como uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. A palavra câncer de origem latina, tem como significado “caranguejo”, possivelmente em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser semelhante às pernas do crustáceo, as quais se introduzem na areia para se fixar e dificultar sua remoção. (ALMEIDA et al., 2005). O tratamento contra o câncer envolve procedimentos tais como cirurgia, radioterapia e terapias sistemáticas. Em etapas iniciais da doença com pacientes de baixo risco, uma simples cirurgia é suficiente, mas em muitos casos o uso de fármacos citotóxicos ou combinação destes é requerido. Dentro das terapias sistemáticas se encontram a terapia hormonal, terapia direcionada, imunoterapia e quimioterapia (FERNANDO; JONES, 2015).

O uso da quimioterapia como tratamento começou no século XX junto com os intentos de encontrar agentes químicos capazes de tratar doenças. Em 1900, o famoso químico alemão Paul Ehrlich desenvolveu fármacos para tratamento de doenças infeciosas. Ehrlich foi o primeiro a documentar com eficácia a atividade de fármacos para tratamento de doenças em animais, como no caso fármacos contendo compostos arsenicais, que foram empregados para o tratamento de sífilis em coelhos. Além disso, Ehrlich também trabalhou, sem muito sucesso, com fármacos citotóxicos para o tratamento do câncer, incluindo o corante anilina e outros agentes alquilantes. (DEVITA; CHU, 2008). Foi Ehrlich quem introduziu o termo quimioterapia, o qual foi definido como o uso de agentes químicos para tratamento de doenças; hoje em dia, o termo mudou apreciavelmente: segundo a *American Câncer Society*, quimioterapia define o uso de medicamentos especificamente para o tratamento do câncer (American cancer society, 2015).

Nas primeiras décadas do século XX foram desenvolvidos os primeiros modelos de câncer em animais, envolvendo os tumores ascítico de Ehrlich e Walker 256, e os sarcomas 37 e 180 (DEVITA; CHU, 2008), em decorrência, principalmente, do desenvolvimento do primeiro sistema de transplante de células tumorais em roedores

por George Clowes do Roswell Park Memorial Institute em Buffalo, New York. Esse avanço permitiu a padronização do sistema de modelos, o que permitiu que um grande número de fármacos viesse a ser testado contra os cânceres. Em 1935, o National Cancer Institute dos USA organizou um programa, sob orientação de Murray Shear, para uso daqueles “modelos de câncer” para testes de possíveis fármacos, e aquele programa foi o primeiro a testar um amplo número de compostos, incluindo produtos naturais. O projeto contava com colaboradores internacionais e interinstitucionais, porém os cientistas que empreenderam aqueles estudos não possuíam ainda as informações e a experiência necessária sobre como realizar testes químicos *in vivo,* e em decorrência disso, dos 3.000 compostos testados com o modelo murine S37, resultou que 2.998 deles tiveram de ser abandonados devido à sua alta toxicidade, enquanto que dois não apresentaram ação antitumoral.

A falha do programa de Shear e o contemporâneo sucesso do tratamento hormonal de homens com câncer de próstata por Charles Huggins (Prêmio Nobel de Medicina em 1966) levou muitos cientistas ao ceticismo, que passaram a questionar a eficácia do uso de produtos químicos no tratamento de cânceres (DEVITA; CHU, 2008). De fato, foi uma catástrofe que abriu definitivamente o estudo sistemático da possiblidade de os produtos químicos serem usados no controle do câncer. Durante a Segunda Guerra Mundial havia sido desenvolvido um composto químico a base de enxofre (gás mostarda), que por acidente contaminou as tropas em Bari Harbor. Neste acidente foi observado o atrofiamento das glândulas linfáticas e problemas na medula óssea das pessoas afetadas. O estudo clínico do gás mostarda foi então realizado por muitos cientistas que examinaram os possíveis efeitos terapêuticos deste gás. Experimentos em roedores foram conduzidos transplantando células de tumor linfoide e tratando com “mostarda nitrogenada”. Diante dos resultados satisfatórios, o gás mostarda nitrogenado foi administrado em um paciente com Linfoma no-Hodgkin e com obstrução severa nas vias aéreas. O resultado foi uma notável regressão da doença no paciente, e assim, foram realizados outros testes em humanos com linfoma, obtendo-se os mesmos resultados. Ainda em meados da Segunda Guerra Mundial foi identificado o ácido fólico, um composto presente em vegetais de folhas verdes, que é importante para o funcionamento da medula óssea. Farber, Heinle and Welch testaram

o ácido fólico em pacientes com leucemia, e chegaram à conclusão que ele acelerava o crescimento das células de leucemia. Diante disso, os cientistas desenvolveram análogos do ácido fólico, a aminopterina e ametopterina, agora conhecidos como metotrexato, os quais foram antagonistas do folato. Este fármaco foi testado em crianças com leucemia, obtendo-se resultados de remissão inquestionável. Baseando-se nestes estudos foram desenvolvidos dois fármacos que são importantes no tratamento da leucemia aguda: 6- tioguanina e 6-mercaptopurina.

Entre 1943-1944 começaram as pesquisas sobre sínteses e testes de compostos alquilantes, tais como o clorambucil e a ciclofosfamida. Foi nesse período que a cisplatina foi sintetizada por Michele Peyrone em Turim, Itália. Este composto foi conhecido como o "cloreto de Peyrone", e suas propriedades antiproliferativas foram observadas por Barnett Rosenberg na Universidade do estado de Michigan, através de estudos com complexos de coordenação de platina (LEBWOHL, 1998). Estes fármacos entre outros, foram empregados no tratamento da leucemia e usados em doenças como herpes viral, gota e como agentes imunossupressores em transplante de órgãos. Como resultado deste importante descobrimento, estes pesquisadores ganharam o prêmio Nobel de medicina em 1988. (DEVITA; CHU, 2008).

Na metade dos anos 1950, Charles Heidelberger e colegas da Universidade de Wisconsin desenvolveram um fármaco para o câncer colorretal. O fármaco foi identificado como a fluoropirimidina 5-fluorouracila (5-FU). Este fármaco representa um dos primeiros exemplos de terapia dirigida, sendo introduzidos no uso clínico em 1958. Entretanto, apesar dos avanços e evidências claras do uso de fármacos ainda se tinha um ceticismo sobre a utilidade clínica na quimioterapia, até que finalmente, um tumor muito raro, o coriocarcinoma, que ocorre na placenta durante a gravidez, foi curado pelo uso do metotrexato. E mesmo com todos os esforços dos médicos e químicos, a quimioterapia na maioria dos centros médicos ainda não era bem vista, pois os produtos químicos ainda eram vistos como venenos (DEVITA; CHU, 2008).

Skipper e colaboradores estudaram camundongos portadores de células L1210 de leucemia, em meados de 1960 sugeriram que seria necessária apenas uma célula sobrevivente ao tratamento do tumor, para desenvolver de novo a doença e matar os

camundongos. Os cientistas basearam-se nestas observações e nas hipóteses de morte celular, para afirmar que a dose de fármaco administrada vai depender da fração constante de células tumorais presentes no começo de cada tratamento. Estas observações mudaram a administração das doses de quimioterapia além de propor combinações de fármacos para o tratamento. Juntamente com Freireich e outros, Skipper estudou crianças com a doença, descobriram a eficácia dos alcaloides da vinca, a vincristina e a vimblastina, e desenvolveram o programa de tratamento conhecido como VAMP, acrônimo da mistura dos produtos químicos Vincristina, Ametopterina, 6-Mercaptopurina, e Prednisona.

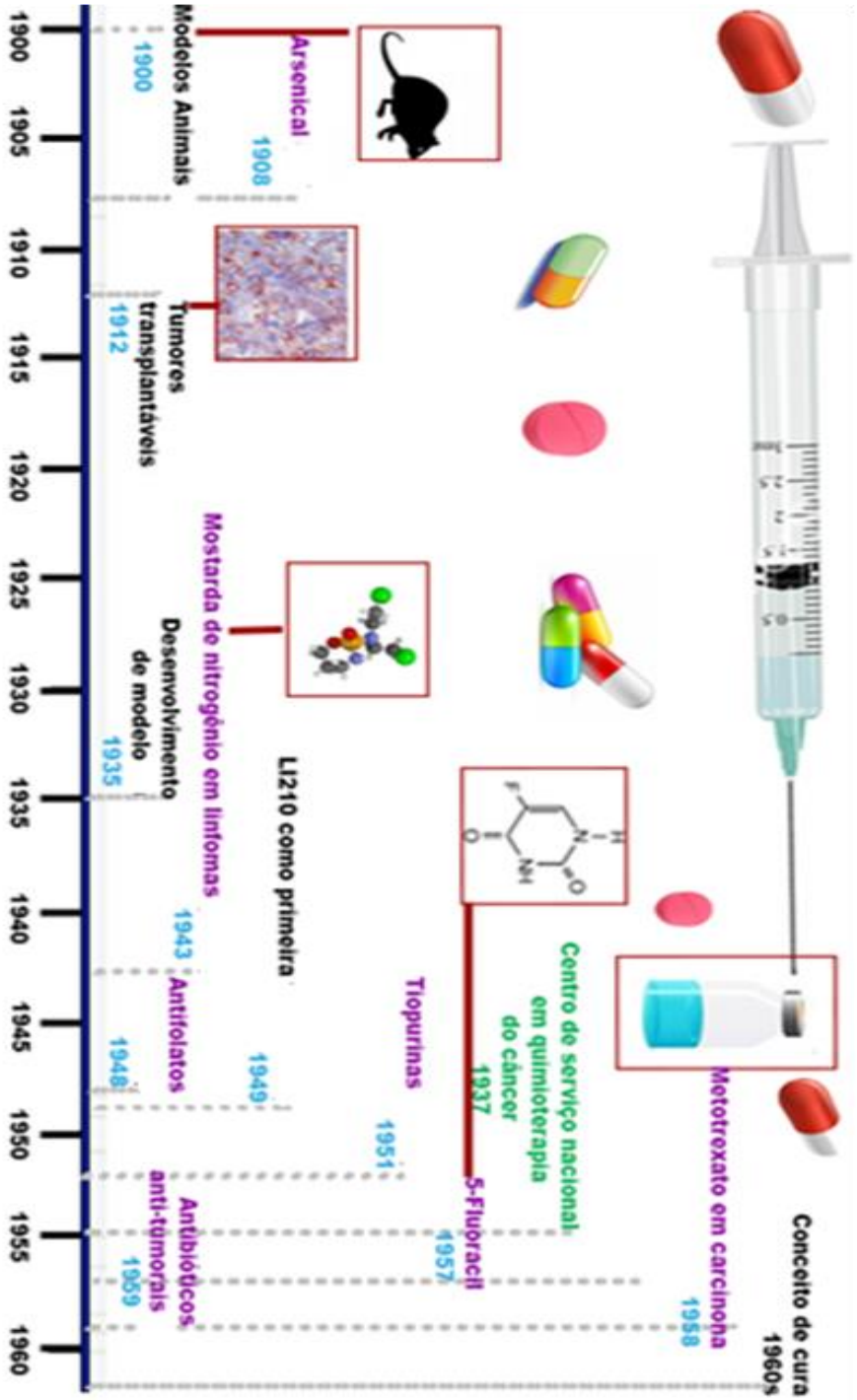
Os clínicos especializados em câncer tiveram ainda o desafio de tornar o tratamento mais fácil, superando as deficiências causadas pela doença e a toxicidade da quimioterapia, através do uso de transfusões de plaquetas para prevenir hemorragias e combinações de antibióticos para tratar infecções. Porém, fatos importantes, como o tratamento de leucemia em crianças, a cura da doença de Hodgking, e a cura do linfoma difuso de grandes células B, usando diversos programas como MOPPC (MOstarda nitrogenada com vincristina, Prednisona, ProCarbazina), MOMP (MOstarda nitrogenada com vincristina, Metotrexato, Prednisone) e C-MOPP o qual substituiu a mostarda nitrogenada pela ciclofosfamida, desencadearam a importância da quimioterapia. (DEVITA; CHU, 2008).

Em 1972, o prêmio Lasker em pesquisa médica foi dado para os pesquisadores que mostraram provas que o câncer poderia, de fato, ser curado com fármacos. A partir disto, o campo da oncologia médica foi oficialmente estabelecido como subespecialidade da medicina interna, com a quimioterapia como ferramenta. Seguindo os trabalhos sobre linfoma, leucemia e câncer de seio, os pesquisadores Lawrence Einhorn e seu grupo, construíram o Memorial Hospital, onde começaram as pesquisas sobre o câncer testicular fazendo uso de cisplatina, vinblastina e bleomicina.

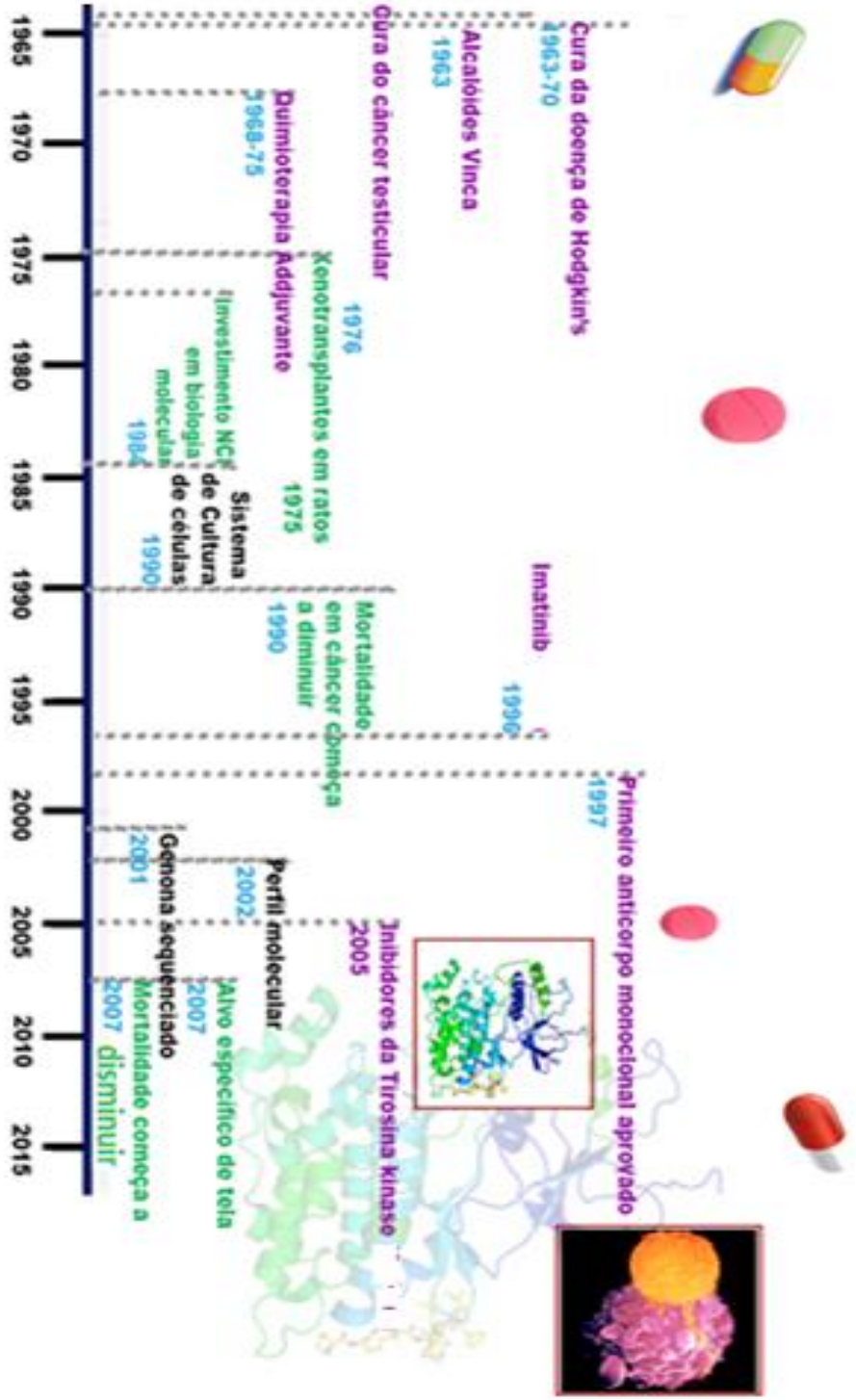
Hoje em dia, os cânceres que têm uma maior taxa de remissão são os linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, as leucemias linfoblastia aguda e mieloide aguda, e os cânceres de células germinativas, câncer de pulmão de pequenas células, ovário e o coriocarcinoma. Em crianças, os cânceres com uma boa taxa de sobrevivência são a leucemia aguda, o linfoma de Burkitt, e os tumores de Wilm e rabdomiossarcoma

embrionário. Embora o tratamento não seja muitas vezes curativo para esses tipos de câncer, tem havido uma melhoria significativa na sobrevida do paciente, livre da progressão da doença. Além disso, vários regimes de quimioterapia são empregados, um deles é a terapia neoadjuvante, que consiste em reduzir o tamanho do tumor primário para facilitar sua remoção, permitindo melhorar o resultado cirúrgico. Hoje em dia, a quimioterapia neoadjuvante tem sido amplamente usada em câncer de ânus, reto, bexiga, esófago e pescoço, além do câncer osteogênico e sarcoma de tecidos moles. De 1990-2007, a incidência e mortalidade do câncer começaram a declinar devido aos avanços no tratamento e diagnóstico precoce (DEVITA; CHU, 2008).

Figura 1: Gráfico resumido da história da quimioterapia (baseado em DEVITA; CHU, 2008)



Continuação da figura 1.



1.2 COMO AGE A QUIMIOTERAPIA

As células cancerígenas diferem de células normais por sua capacidade de crescer e sobreviver. Mutações adquiridas pelos proto-oncogenes e genes supressores de tumor promovem a divisão celular, devido à perda da habilidade da célula regular e de realizar seu ciclo normal. As células tornam-se então insensíveis aos sinais que inibem o seu crescimento, e assim conseguem evitar a morte celular. Os quimioterápicos interferem diretamente no DNA ou nas proteínas chaves na divisão celular, causando a morte celular de células que estão em processo de divisão, por meio de sinais de morte celular programada ou apoptoses. (FERNANDO; JONES, 2015).

Para entender como agem os fármacos quimioterapeuticos é preciso entender o ciclo de divisão celular. Para manter a homeostase celular no organismo, um número igual de células nasce e morre em uma dada unidade de tempo. Portanto, a divisão celular deve ser equilibrada pela morte celular, ambas as vias sendo igualmente ativas. “Aberrações” nessas vias algumas veces levam ao câncer. O ciclo de divisão celular é muito importante porque os fármacos antitumorais somente exercem sua ação em células que estão dividindo-se ativamente, e é por isso que tanto células normais e cancerosas são atingidas na quimioterapia, ocasionando os chamados efeitos colaterais. O modelo de ciclo celular divide-se em duas etapas, a interfase e a mitose ou cariocinese. A interfase compreende três fases designadas como: G1, S e G2 (Figura 2). Na fase S acontecem as sínteses e a duplicação do DNA. As fases e intervalo ou *gap*, G1 e G2, separam a fase M (fase onde ocorre a mitose) da fase S e a fase S da fase M. No intervalo G1 a célula cresce continuamente, e são produzidas as sínteses de algumas enzimas imprescindíveis para a fase seguinte, fase S. No G1 é onde se controla uma importante decisão celular: continuar proliferando ou entrar em período quiescente (G0). A G2 é outro ponto de checagem, onde a célula permanece até que todo o genoma seja completamente replicado e reparado antes de ser transmitido às células-filhas. Na fase M ocorre a mitose, levando à separação dos cromossomos, das organelas celulares, e do citoplasma da célula parental em duas

células filhas. As células de tecidos que possuem uma renovação rápida são extremadamente sensíveis a agentes ou tratamentos químicos ou físicos (quimioterapia ou radioterapia) que afetam a replicação do DNA. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). O ciclo celular é regulado pela atividade de quinases dependentes de ciclinas (Cdks, cyclin-dependent kinases). Uma proteína-quinase tem como atividade básica a fosforilação de outras proteínas substratos, em outras palavras, seu papel fundamental é transferir um fosfato do ATP para os aminoácidos serinas ou treoninas de outras proteínas. As Cdks são ativadas e inativadas ao longo do ciclo e são fortemente reguladas pelas proteínas ciclinas, as quais são sintetizadas ao longo de todo o período interfásico e são degradadas rapidamente no final da mitose. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; DEVLIN, 2011). As Cdks desenvolvem sua função de quinases só quando elas conseguem-se ligar as ciclinas, formando um heterodímero Cdk-ciclina. A classificação das ciclinas são por letras (A,B,C,D,E até J) e as Cdks são aproximadamente 8 (Cdk1, Cdk2, Cdk3 até 8). Nos vertebrados, essas ciclinas formam complexos com quatro diferentes tipos de Cdks. As ciclinas D complexam-se com Cdk-4 e Cdk6, as E com Cdk2, as ciclinas A com Cdk2, e as ciclinas B com Cdk1. Em seguida, os fosfatos ativadores corretos são adicionados por uma quinase ativadora dependente da ciclina (CAK, cyclin-dependent activating kinase), a qual fosforila um aminoácido próximo ao sitio ativo da Cdks, causando uma mudança conformacional que aumenta a eficiência da Cdk em fosforilar proteínas relevantes no ciclo e os fosfatos inibidores que são removidos por uma CDC25 fosfatase para gerar a atividade de Cdk que regula a etapa do ciclo celular. Ao final de cada etapa do ciclo celular, a proteína cíclina do complexo ciclina-Cdk é poliubiquitinada por uma ubiquitina ligase, e a ciclina poliubiquitinada é degradada, desligando a atividade da Cdk associada e permitindo que a via do ciclo celular prossiga para a etapa seguinte da via. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005, DEVLIN, 2011) A inativação do complexo ciclina-Cdk é produzida pela proteína Weel a qual é uma quinase de fase G2/ M que fosforila Cdk1 (conhecida como CDC2, responsável pela fase M) em um sitio inibitório (Pi), impedindo a atividade da Cdk1 e promovendo a entrada da célula na fase M. Os sinais que impedem uma célula de prosseguir para a fase M são gerados por replicação incompleta do DNA e por dano no DNA. Quando a célula está preparada para continuar

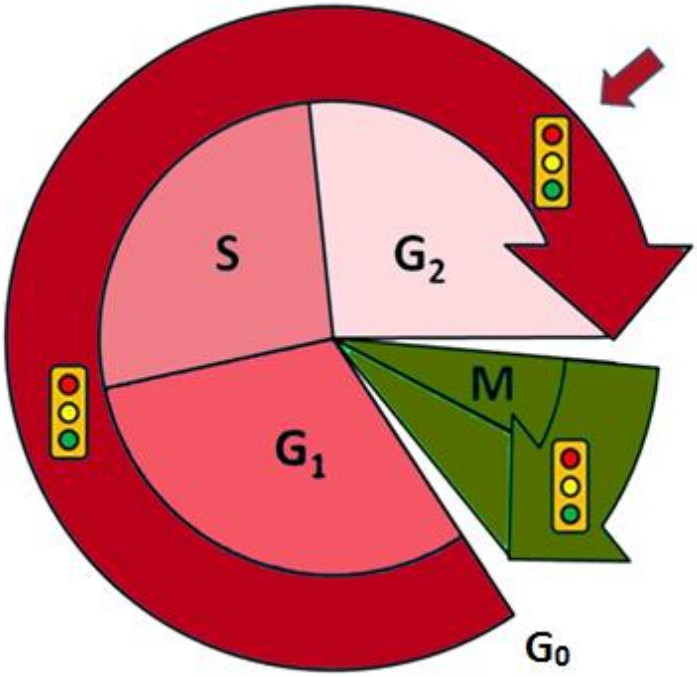
na fase M, a atividade do complexo é restaurada pela remoção do grupo fosfato inibitório pela proteína fosfatase Cdc25. A Cdc25 é ativada pela proteína pólo-quinase, que também fosforila os sítios ativos.

Por outro lado, existe outro tipo de proteínas chamadas de CKIs (Cdk inhibitor proteins), as quais se ligam as Cdks inativando-as. Estas proteínas se encontram principalmente no controle das fases S e G1 do ciclo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Na fase G1/ S o substrato que regula as Cdks é a proteína Rb (proteína de sensibilidade ao retinoblatoma), assim denominada por sua deficiência no câncer retinoblastoma (DEVLIN, 2011).

Outra proteína chave na regulação do ciclo celular é a p53, a qual é denominada “O guardião do genoma”. Quando acontece uma lesão no DNA celular, a p53 detém o ciclo celular para que a célula repare seu DNA. Se a lesão no DNA for irrecuperável, p53 induz a morte celular por apoptoses. A perda da função de p53 resulta na divisão celular com o DNA danificado, uma propriedade das células do câncer (DEVLIN, 2011).

Dessa forma é muito importante compreender como os fármacos quimioterapeuticos agem no ciclo celular. Isso permite que oncologistas realizem as combinações de fármacos que devem ser administradas e também a frequência da administração da dose com base no comprimento das fases celulares (American cancer society, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; DEVLIN, 2011).

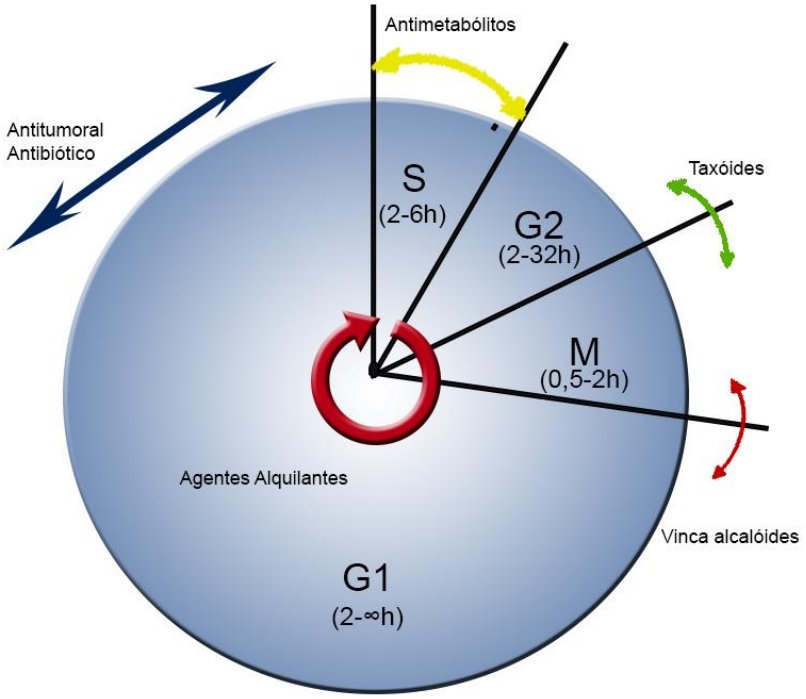
Figura 2: Ciclo de divisão celular (os semáforos representam os pontos de checagem do ciclo de divisão celular). Baseado na página: (https://www.youtube.com/watch?t=139&v=iEB8q9aR8#kcellcyclecheckpoints).



1.2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES CITOTÓXICOS

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos de ciclo celular específico e fármacos de ciclo celular não específico. Mais especificamente, a classificação bioquímica denomina alguns dos grupos de agentes citotóxicos mais empregados na quimioterapia como agentes genotóxicos (agentes alquilantes, agentes intercalantes, inibidores de enzimas e inibidores de mitoses) e antimetabólitos.(Figura 3).

Figura 3: Ação dos fármacos antitumorais durante o ciclo de divisão celular. Figura baseada em (FERNANDO; JONES, 2015)



- **Agentes genotóxicos:** ligam-se ao DNA ou causam danos indiretamente através da alteração de enzimas presentes na replicação. Deste modo, induzem a apoptose. Estes fármacos dividem-se em:

(i) ***Agentes alquilantes do DNA***: são medicamentos que causam danos direto ao DNA através da modificação de suas bases. Isto permite que seja evitada a proliferação de células cancerosas. Estes medicamentos não são específicos e agem em todas as fases do ciclo celular (Figura 4). Os agentes alquilantes são utilizados para tratamento de diferentes tipos de cânceres tais como: leucemia, linfoma, a doença de Hodking, Mieloma multipla e sarcoma, e os câncer de pulmão, seio e ovários. Os medicamentos deste grupo podem causar danos a longo prazo na medula óssea. Em certos casos podem causar leucemia aguda. Por esta razão é importante

empregar doses baixas e limitar o tempo de uso. O risco de leucemia depois da administração de agentes alquilantes é aproximadamente de cinco a dez anos depois do tratamento. Alguns exemplos que correspondem a este grupo são as Triazinas: dacarbazina (DTIC) e temozolomida (Temodar®)(LUQMAN, 2005).

Os medicamentos à base de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) algumas vezes são vinculados neste grupo, pois destroem as células cancerosas de forma similar. Porém, estes medicamentos possuem menor probabilidade de causarem leucemia no futuro, diferentemente dos agentes alquilantes acima descritos. (LUQMAN, 2005)(American Cancer Society, 2015)

(ii) ***Agentes intercalantes:*** se ligam aos sulcos na hélice do DNA, interferindo com a atividade da polimerase durante a replicação/transcrição (Figura 4). Dentro deste grupo estão as antraciclinas**,** as quais são antibióticos, intercalantes de DNA em sequências específicas, criando radicais que causam a quebra da fita. Estes antibióticos são produzidos pelo fungo *streptomyces*, e também agem sobre as topoisomerases I e II, requeridas para o desenrolamento do DNA na síntese do mesmo. Estes medicamentos agem em todas as fases do ciclo celular e também são empregados no tratamento de vários tipos de câncer. Um ponto a ressaltar, é que estes medicamentos podem causar danos permanentes no coração se forem empregadas altas doses. (LUQMAN, 2005)

(iii) ***Inibidores do fuso mitótico***: são fármacos que não alteram a estrutura nem a função do DNA. Os inibidores da mitose com frequência são alcaloides de origem vegetal e outros compostos derivados de produtos naturais (Figura 4). Este grupo de medicamentos consegue impedir a mitose ou evitar com que as enzimas sintetizem proteínas necessárias para a produção de células, afetando assim a divisão celular. Durante a mitose, o DNA da célula é replicado e depois dividido em duas células novas. O processo que separa os cromossomos que foram replicados em duas células necessita de fibras de fuso. Estas fibras estão constituidas por microtúbulos que se unem aos cromossomos replicados e separam uma cópia para cada lado da célula em divisão. Na ausência destas fibras de fuso, a célula não pode se dividir e

morre. Agentes inibidores de fuso funcionam de uma maneira dependente do ciclo celular, parando a divisão celular durante a mitose. Os inibidores de mitose exercem sua ação durante a fase M do ciclo celular, e conseguem provocar danos em todas as fases. Estes medicamentos são empregados no tratamento de câncer de seio, de pulmão, mielomas, linfomas e leucemias. Devido à sua natureza, deve-se controlar as doses, pois provoca danos aos nervos periféricos. Exemplos de fármacos são Placlitaxel, vinca alcaloides e o sintético docetaxel (Taxotere®). (CALEI; JONES, 2012; LUQMAN, 2005)

(iv) Inibidores de enzimas: Estes compostos bloqueiam a replicação do DNA por meio da inibição de enzimas, como por exemplo, as topoisomerases, as quais ajudam a separar as fitas do DNA para que consigam realizar a cópia. Os Inibidores da Topoisomerase são empregados no tratamento de leucemias, câncer de pulmão, ovários, gastrointestinais, entre outros. Alguns exemplos de inibidores da Topoisomerase I são Topotecan e irinotecan. Inibidores da Topoisomerase II são etopósido (VP-16), mitoxantrona e tenipósido. O tratamento com inibidores da topoisomerase II aumenta o risco de um segundo câncer, a leucemia mielógena aguda (LMA). A leucemia secundaria pode surgir após 2 ou 3 anos após a administração do medicamento. (LUQMAN, 2005)

- **Antimetabólitos:** são análogos estruturais dos metabólitos presentes na natureza envolvidos nas sínteses de DNA ou RNA. Eles geralmente substituem um metabólito que é normalmente incorporado no DNA ou RNA, ou competem com o sitio catalítico de uma enzima chave (Figura 4). Estes agentes causam danos nas células durante a fase S. Alguns exemplos destes tipos de fármaco incluem folatos, pirimidina e purina antagonistas.

(i) ***Folato antagonista ou antifolatos***: Folatos são coenzimas requeridas para metilação e necessárias na formação de purinas e timidilatos, como a TMP, timidina monofosfato). Os antifolatos, como o metotrexato, são inibidores de diidrofolato redutase (DHFR), enzima responsável pela redução de diidrofolato (FH_2) a tetraidrofolato (FH_4). A inibição desta enzima impede a formação de FH_4, com

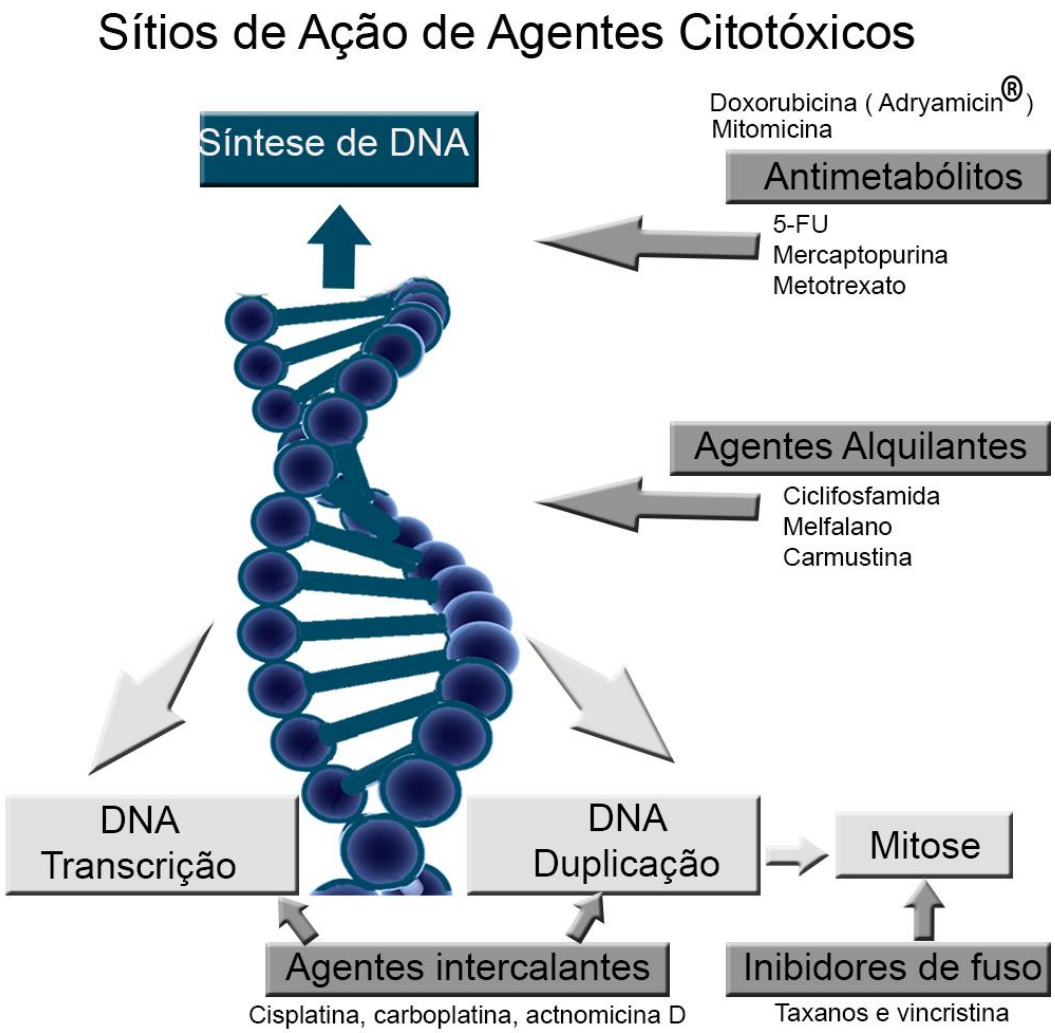
consequente acúmulo do substrato inibitório (tóxico), o poliglutamato de FH_2, que provoca a interrupção da reação de redução. A ausência de folatos reduzidos impedem a ocorrência das reações de transferência de um carbono essenciais para a síntese de nucleotídeos de purina e de timidilato e, portanto, as sínteses de DNA e RNA. Metotrexato (MTX) é usado para tratamento para leucemia linfocitica aguda, células de linfomas grandes, coriocarcinoma e câncer de seio, bexiga, cabeça e pescoço, como também em doenças inflamatórias (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; LUQMAN, 2005).

(ii) ***Antagonista de Pirimidina****:* Estes compostos bloqueiam a formação de nucleotídeos que contém pirimidinas, ou causam a terminação prematura da replicação do DNA, através da sua incorporação dentro da cadeia crescente de DNA, o que leva à terminação do processo. Os fármacos que pertencem a esta categoria são 5-fluorouracila (5-FU, Adrucil®, Fluorouracil, Efudex®, fluoroplex®), gemcitabina (Gemzar®) (LUQMAN, 2005).

(iii) ***Antagonista de Purina*****:** Estes compostos inibem a síntese de adenina e guanina, e alguns exemplos são acyclovir, 6-mercaptopurina (purinetol®, puri-netol®) e 6-tioguanina. Eles são empregados no tratamento de leucemia linfoide aguda ou leucemia linfoblastica aguda, leucemia mielóide aguda e leucemia mielomonocitica (LUQMAN, 2005).

Outros medicamentos empregados no tratamento do câncer são: agentes de diferenciação, terapia hormonal, imunoterapia e corticoesteroides.

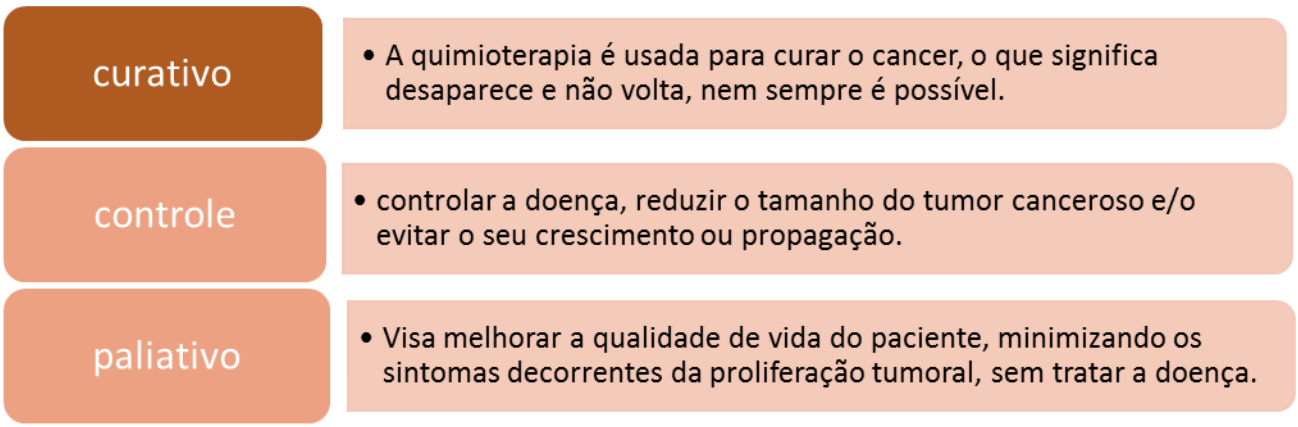
Figura 4: Ação dos fármacos antitumorais no DNA (baseada em LUQMAN, 2005)



1.3 USOS CLÍNICOS DA QUIMIOTERAPIA

O tratamento com quimioterapia depende da história clínica do paciente e características do tumor. Geralmente, a quimioterapia pode ser classificada de acordo com sua finalidade como terapia adjuvante (depois de retirado o câncer mediante cirurgia e pode ajudar a eliminar células restantes) ou neoadjuvante (antes da cirurgia a quimioterapia pode diminuir o tamanho de tumor, facilitando a extirpação). Tratamento de doenças metastáticas tem um objetivo mais paliativo, com algumas

exceções. Existe um amplo espectro de sensitividade para quimioterapia que depende dos diferentes tipos de tumor. Como regra geral, as neoplasmas que tem capacidade de dividir-se mais rapidamente, são mais quimo-sensíveis. Resumindo-se, os três objetivos possíveis da quimioterapia são:



1.3.1 EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA

A maioria dos agentes anti-neoplásicos atuam de forma não específica, lesando tanto células malignas como benignas. A toxicidade da quimioterapia varia dependendo do agente, doses, caminho, esquema de administração e fatores de predisposição do paciente. Os efeitos secundários podem incluir mielosupressão com leucopenia, trombocitopenia, anemia, ulceração em membranas mucosas e alopecia. Outros efeitos colaterais menos comuns são específicos para cada fármaco, por exemplo, a ocorrência de cistites com hemorragia pelo uso do fármaco Ifosfamida (FERNANDO; JONES, 2015).

1.3.2 RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTITUMORAIS

Resistência à quimioterapia é umas das razões pelas quais muitos tratamentos fracassam, em qualquer tipo de tumor. Em muitos casos, pacientes que inicialmente respondem para quimioterapia apresentam uma perda de resposta, e como resultado o

tumor continua seu crescimento. São reconhecidos dois tipos de resistência: a intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do tratamento, e a adquirida, quando surge no segundo ciclo (pós-terapia).

1.3.2.1 CAUSAS DA RESISTÊNCIA A ANTITUMORAIS

Alguns destes mecanismos que poderiam ser utilizados pelas células cancerígenas para resistir aos agentes citotóxicos são provavelmente mecanismos de defesa das células normais para combater os ambientes cancerígenos. Dentre estas possíveis causas podem ser citados:

-Redução da liberação dos agentes citotóxicos na célula: Quando os tumores aumentam de tamanho, eles precisam de sangue e nutrientes, criando regiões no tumor onde existem células em hipóxia. Nestas regiões, a vascularização é baixa, o que limita a concentração do fármaco que atinge a região (FERNANDO; JONES, 2015).

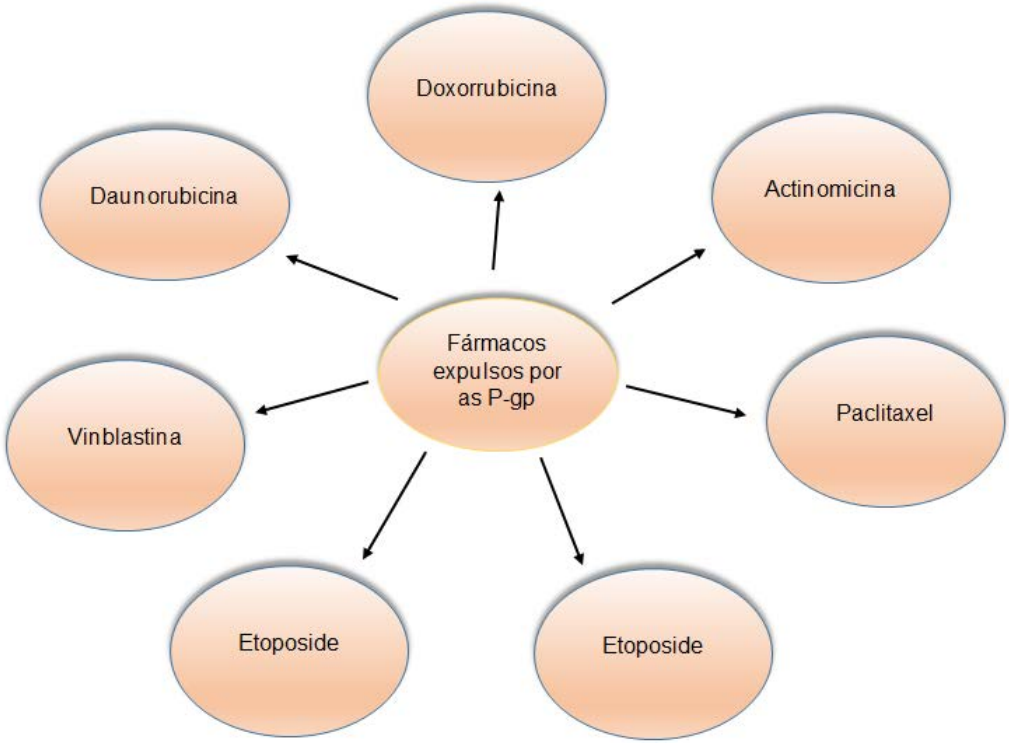
-Diminuição da captação do fármaco: alteração na estrutura ou função da proteína que está envolvida no transporte do fármaco citotóxico afeta a quantidade disponível do fármaco. Por exemplo, um defeito no sistema carregador de redução de folato confere resistência para o fármaco metotrexato (FERNANDO; JONES, 2015).

-Diminuição na ativação do fármaco: muitos dos fármacos empregados na quimioterapia são pro-fármacos, que requerem ativação metabólica por meio de enzimas chaves. A carboxilesterase é necessária para a ativação do cloridrato de irinotecano, e para isto precisa da bio-ativação do seu metabólito SN-38; reduzir a expressão da enzima pode causar resistência ao fármaco (FERNANDO; JONES, 2015).

-Incremento do fluxo do fármaco: alguns tumores apresentam resistência a certos agentes, e uma razão é devido à presença de proteínas transportadoras que bombeiam ativamente o fármaco para fora das células, como a família *ATP-binding cassette,* também conhecida como família de ABC. É a maior família de proteínas

transportadoras, que tem como função absorção, distribuição e excreção de muitos substratos, que podem ser íons, açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, colesterol, peptídeos, polissacáridos, proteínas e fármacos diversos. Até o dia de hoje se tem conhecimento de três tipos de proteínas transportadoras relacionadas com a resistência aos fármacos que são a glicoproteína P, MRPs (proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos), e BRCP (proteína associada à resistência do câncer de seio). Assim, aquelas proteínas têm um papel muito importante na proteção das células contra agentes xenofóbicos, tornando-as resistentes a muitos tipos de drogas (MRD, de Multiple Drug Resistent cells). Por exemplo, na resistência a drogas, o gene MDR-1 codifica para a proteína trans-membrana glicoproteína P, que utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP, promove o efluxo dos fármacos quando o gene está sobreexpressado. A Figura 5 mostra os fármacos eliminados pela glicoproteína P (MASTERS, 1990).

Figura 5: Fármacos anticancerigenos transportados (expulsos) pela P-pg.



-Alteração em proteínas alvo: Este fenômeno ocorre possível durante o tratamento. Os alvos da terapia podem ser modificados de alguma forma, e deixam de ter qualquer influência celular significativa e, por tanto, não mais serão alvos úteis para se bloquear. Por exemplo, pacientes com câncer de seio, tratados com o anti-estrogênio (tamoxifen), podem adquirir uma resistência endócrina, a qual é caracterizada por uma perda dos receptores de estrogênio nas células tumorais resistentes.

Outro exemplo é a topoisomerase, que é vital na replicação do DNA, e, portanto, um dos alvos favoritos dos agentes citotóxicos. A mutação nesta proteína causa a insensibilidade para os fármacos, como o etoposido, o qual está projetado para bloquear a atividade da topoisomerase II. (LUQMAN, 2005)

-Aumento na reparação do DNA: A capacidade de reparação do DNA é um processo evolutivo de adaptação das células, para se proteger de radiações perigosas e compostos químicos nocivos, sendo, portanto fundamental para manter as células sadias. O mesmo caminho pode proteger as células cancerígenas contra os letais efeitos da radioterapia e da quimioterapia, resultando em resistência.

O reparo do DNA é um tema complexo devido a que são muitas formas nas quais o DNA pode sofrer alterações, envolvendo fitas simples ou duplas, incluindo mutações, danos nas bases, entrecruzamento, entre outros. O reparo de cada tipo de dano necessita de uma estratégia bioquímica diferente, requerendo muitas vezes um grande número de enzimas. (MASTERS, 1990). Por exemplo: o reparo de dano de excisão de uma base requer no mínimo quatro passos: (1) reconhecimento das bases danificadas; (2) recorte da fita de DNA, perto ou no sitio do dano; (3) remoção de qualquer dano na base, e (4) substituição da base danificada. Assim, quaisquer anormalidades nas enzimas como O6-alquilguanina-alquiltransferasa ou alterações nos genes que reparam a excisão do DNA, parecem estar entre as causas de resistência. A sobre-expressão do gene ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing 1), está associada à resistência aos fármacos que contém platina (SÁNCHEZ-SUÁREZ; BENITEZ-BRIBIESCA, 2006).

-Incapacidade para sofrer apoptoses: Os tecidos normais, em contraste com os neoplásicos, não adquirem resistência à quimioterapia. Este fenômeno deve-se aos tecidos normais que estão intactos e em bom funcionamento, com toda "maquinaria genética", que controla os chamados pontos de checagem do ciclo celular e da morte celular programada (apoptoses). Estas checagens não permitem que células com danos no DNA consigam dividir-se, deste modo, interrompem o ciclo celular até que este seja reparado, ou emitem sinais que levam à morte celular programada. A alteração destes sistemas de controle de crescimento celular pode ser uma das causas da resistência aos agentes citotóxicos. O não funcionamento correto destes mecanismos leva uma célula com danos no reparo do DNA a se replicar continuamente, no lugar de deter sua duplicação, contribuindo a erros genéticos.

A proteína p53 tem a função de ativar a transcrição do DNA, e, portanto, pode agir como supressor de tumor. Quando a célula é exposta a fármacos que causam danos no DNA, ela age, detendo o ciclo celular ou na fase G1, ou na G2 (Figura 3). Caso o reparo ao DNA não seja mais possível, a proteína p53 induz a apoptose. As mutações no gene que codifica esta proteína são frequentes em tumores humanos, e as alterações na regulação da apoptose e dos pontos de controle do ciclo celular podem ser causas de resistência aos agentes citotóxicos.

-Incremento no metabolismo do fármaco e detoxificação:

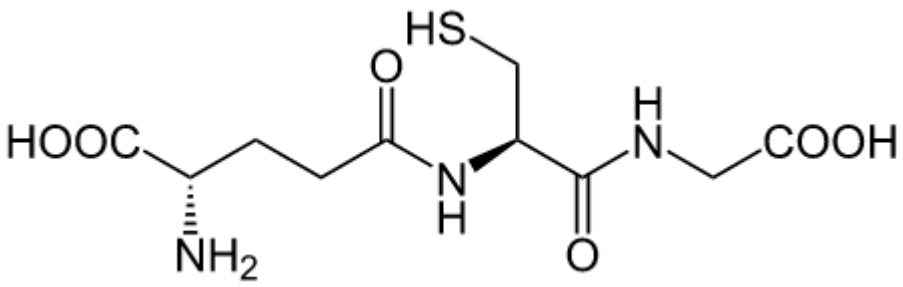
A resistência aos agentes citotóxicos é um problema na quimioterapia. As células cancerígenas usam muitas estratégias para sobreviver aos tratamentos. Além do transporte ativo do fármaco mencionado anteriormente, outro mecanismo importante de resistência merece destaque, a detoxificação de fármacos dentro da célula, usando enzimas de detoxificação da fase II (KARWICKA, 2010). A principal rota de detoxificação oxidativa para fármacos, agrotóxicos, e outros agentes em mamíferos envolve as enzimas P-450 monoxigenases, metalotioneína, e glutiona-s-transferase (HAYAKAWA; UNDENFRIEND; JERINA, 1975).

O mecanismo de detoxificação mediado pela enzima glutationa-s-transferase (GSTs), é foco nesse primeiro trabalho, que compreende uma família de enzimas

multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico. Os substratos (eletrófilos) mais comuns das glutationa transferase incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β-insaturados (como quinonas, iminoquinonas aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos. As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir), apresentando dois sítios ativos independentes por dímero, um deles muito específico para a glutationa reduzida (GSH), e o outro, com menor especificidade, para os eletrófilos. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

A glutationa reduzida (GSH) (Figura 6), cujo nome químico é ɣ-glutamilcisteinilglicina (ɣ-glu-cys-gly) possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. A GSH é um tripeptídeo que é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. A biossínteses da GSH ocorre no citosol da célula de L-α-glutamato (glu), L-ɣ-cisteina (Cys) e glicina (gly) em uma reação de duas etapas, envolvendo ɣ-glutamilcisteina sintetase (ɣ-GCS) e glutationa sintetase (ɣ-GS)(Figura 7), sendo este o mais abundante composto tiol celular de baixa massa molecular; apresentando uma concentração de 2 mmol L^{-1} e mais de 10 mmol L^{-1} em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A GSH mantém o estado redox na célula. A grande maioria das reações de GSH envolve o grupo sulfidrila (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutationa um bom redutor. A combinação de sua abundancia nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidrila suporta a proposta de que o GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

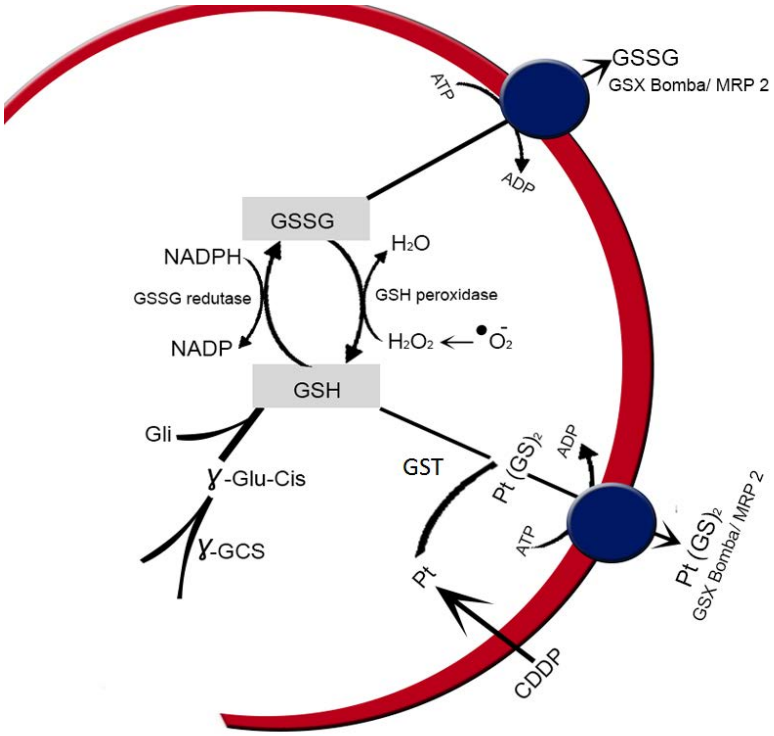
Figura 6: Estrutura química do substrato glutationa reduzida (GSH)



A glutationa reduzida reage com as espécies reativas de oxigênio (ROS) formando GSSG, e, então, é transformado de novo à forma reduzida. O stress oxidativo pode afetar esta capacidade de regeneração, e como resultado o GSSG é acumulado no citosol. Este incremento se associa à doenças como estresse mental ou corporal, incremento no esforço físico ou efeitos de compostos tóxicos. Para manter o balanço redox, a GSSG pode ser removida para o exterior da célula ou pode reagir com grupos sulfidrila de proteinas, formando mistura de dissulfetos de proteina e glutationa. De forma similar, a glutationa consegue inativar muitos agentes quimioterapêuticos antes de atingir seu alvo, e estes são expulsos para fora da célula (Figura 7). A reação de conjugação que sofre a GSH com os agentes citotóxicos ocorre espontaneamente por meio da enzima glutationa-s-transferase (KARWICKA, 2010).

Em células cancerígenas resistentes aos efeitos dos fármacos anticancerígenos foram encontrados altos níveis de glutationa quando comparadas com células normais devido a um incremento da expressão do gene ɣ-GCS. GSH participa na detoxificação dos fármacos contendo platina, arsênicos, agentes alquilantes (melphalan), antraciclinas (doxorubicina, daurubicina). Além disto, a glutationa favorece processos de reparo ao dano do DNA causados por estes fármacos (KARWICKA, 2010).

Figura 7: Mecanismo redox da célula envolvendo as enzimas GSTs e detoxificação da cisplatina (Baseada CHEN; e KUO, 2010)

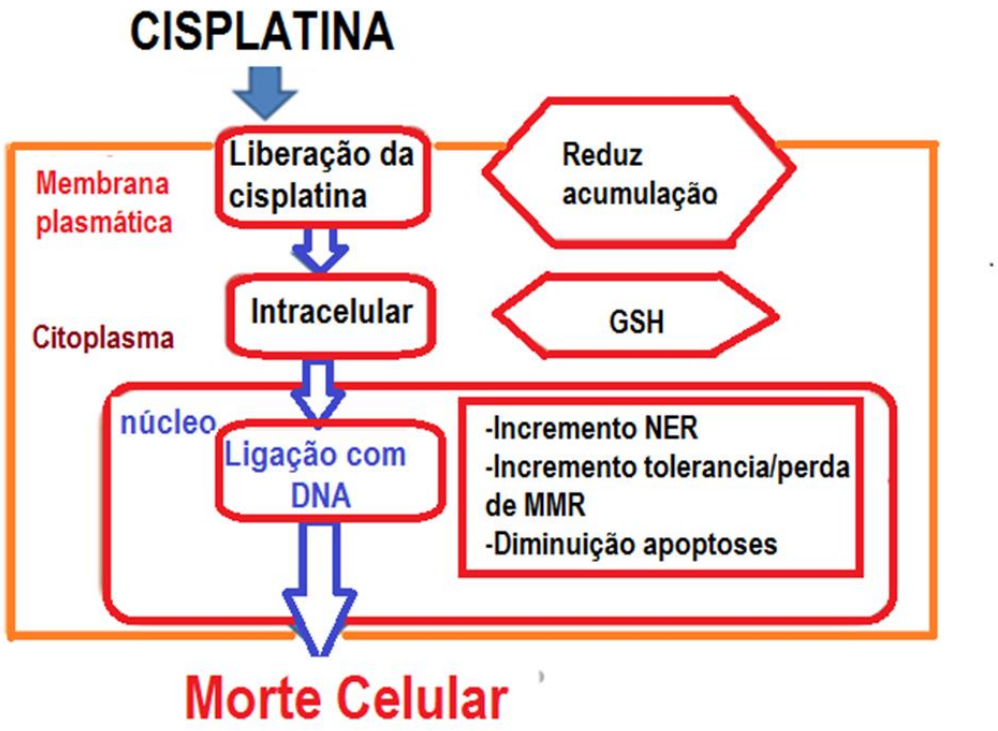


1.3.3 ***RESISTÊNCIA À CISPLATINA***

Atualmente, a cisplatina é usada no tratamento de diferentes tipos de câncer, mas sua eficácia é limitada devido ao fato de que alguns tumores tem uma resistência natural a este fármaco, e outros desenvolvem a resistência durante o tratamento.O mecanismo que explica esta resistência ainda não está bem estabelecido. Porém, alguns estudos têm sido realizados para elucidar os possiveis mecanismos. Dentre eles podem-se citar: *i)* mudança no transporte do fármaco que leva à disminuição de acumulação do mesmo; *ii)* inativação pelo sistema de desintoxicação provocada por níveis elevados de proteínas intracelulares contendo grupos tiol, dentre eles, glutationa-

S-transferase (GST), metalotioneína (MT) e glutationa reduzida (GSH); *iii)* aumento de reparação/tolerância de adutos DNA-Pt e *iv)* mudança nas vias de morte celular por apoptose. Na Figura 8, mostra-se um esquema dos mecanismos relacionados à resistência ao fármaco cisplatina.

Figura 8: Resumo dos principais mecanismos considerados na resistência ao agente antitumoral cisplatina. (baseado em Cepeda Victoria et al, 2007). Reparo por excisão de nucleotídeos (NER, Nucleotide Excision Repair), Reparo de pareamentos errados (MMR, Mismatch Repair)



1.3.3.1 FUNÇÂO DA GSH NA RESISTÊNCIA À CISPLATINA

A resistência aos fármacos é um elemento chave na falha de agentes anticancerígenos na quimioterapia. A exposição a agentes quimioterápios pode levar à indução e expressão de produtos de genes que protegem a célula tumoral do efeito dos

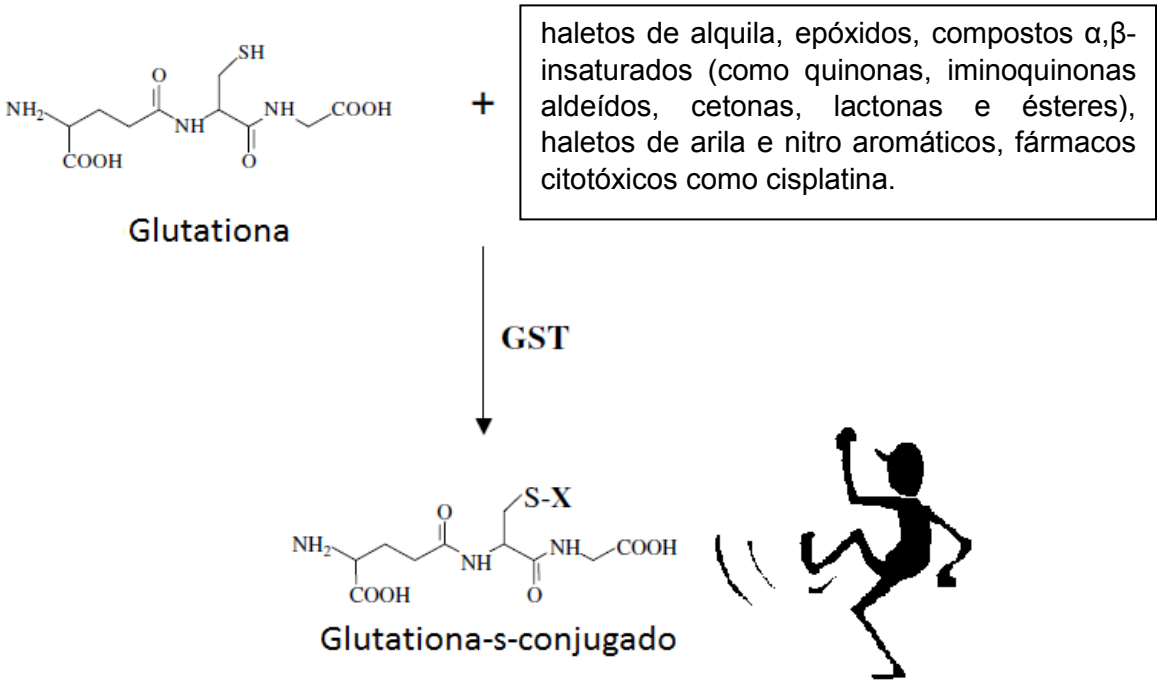
fármacos. Na literatura se tem reportado a função dos GSTs no desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterapêuticos, inseticidas, herbicidas e antibióticos microbianos (TOWNSEND; TEW, 2003). No momento, são conhecidos alguns possiveis caminhos que explicam a resistência induzida pela GSTs: *(i)* Efeitos de GSH no ATP-binding cassette transporter (ABC); (*ii*) Mecanismo de detoxificação da cisplatina;(*iii*) regulação de cobre intracelular que afeta a captação do fármaco; (*iv*) Inibição da via de sinalização JNK (c-junk N-terminal quinases), conduzindo à diminuição na apoptose induzida por cisplatina (TOWNSEND; TEW, 2003; KARWICKA, 2010).

Com relação ao efeito do GSH no sistema transportador ABC, é conhecido que esta família de proteínas citoplasmáticas de membrana funciona como bomba de efluxo na eliminação de agentes antitumorais, xenobióticos e constituentes endógenos. Alguns destes transportadores requerem GSH como substrato, podendo ser empregada na reação de conjugação com a cisplatina antes de ser usada como substrato dos transportadores. ISHIKAWA e ALI-OSMAN foram os primeiros a reportar a formação do conjugado $Pt(GS)_2$ em células leucêmicas da linhagem L1210 (ISHIKAWA T; ALI-OSMAN, 1993; KARWICKA, 2010).

Nos primeiros estudos relacionados com o mecanismo de detoxificação, foi demonstrado que a resistência à multidrogas está associada com alterações significativas no perfil da enzima dependente de glutationa, e como um resultado deste processo, obtém-se alterações dos níveis de glutationa reduzida. As diferenças nas concentrações de enzimas dependentes de glutationa, tais como GST (Glutationa-s-transferase), gama GT (gama-glutamil transferase) e GPX (glutationa peroxidase), foram observadas em duas linhagens de células de ovário de adenoma tomadas a partir de um único paciente: nas linhagens de células sensíveis (PE01), e após o desenvolvimento da resistência para o clorambucil, cisplatina e 5-fuorouracil, linhagen de células (PE04). Na linhagem resistente à droga (PE04), uma maior atividade das três enzimas e um maior nível de glutationa reduzida (GSH) foram observadas em comparação com a linhagen sensível (PE01). (KARWICKA, 2010)

Como mencionado anteriormente a glutationa-s-transferase pertence a uma família de enzimas que catalisam a reação de conjugação de substrato eletrofílico com as moléculas de GSH. A ampla gama de substratos para a GSTcitosólico em humanos resulta do alto grau de polimorfismo e baixa especificidade da ligação formada. Esta propriedade de GST permite metabolização e desintoxicação de diversos substratos, como produtos endógenos da peroxidação lipídica, DNA, peróxidos e xenobióticos (cancerígenos, impurezas e fármacos) (Figura 9) (KARWICKA, 2010).

Figura 9: Mecanismo representativo da detoxificação do cisplatina (adaptado de TOWNSEND.; TEW, 2003).



A GST é o principal tema de estudos sobre resistência à múltiplas drogas em câncer. No entanto, outras enzimas que participam na síntese de GSH e do metabolismo também estão envolvidas na resposta da célula ao efeito de quimioterápicos. Nas condições de aumentar a expressão GST, também aumentam os níveis de atividade de outras enzimas como, GPX e γ-GT. Além disso, a GST tem sido

proposta como um possível “target” terapêutico e pode desempenhar um papel importante na etiologia de outras doenças, incluindo doenças degenerativas, escleroses múltiplas e asma (TOWNSEND; TEW, 2003). Um aumento nos níveis das GST encontra-se relacionado com os transportadores de cobre. CHEN e KUO, 2010, demonstraram que os níveis elevados de GSH, por si só podem sensibilizar toxicidade à cisplatina. A elucidação da produção de GSH que funciona como um quelante de cobre na regulação do seu transportador hCTR1 (human copper transporter 1) tem implicações importantes na quimioterapia do câncer, utilizando agentes antitumorais à base de platina.

A relação entre as GST e a via da MAP–quinases (via de sinalização, MAP-quinase, Mitogen Activated protein kinase, Proteina-quinase ativadas por mitógenos) fornece a explicação do porquê outras drogas não estão sujeitas a conjugação com GSH, e do porquê não são substratos para as GST. Muitos agentes anticancerígenos induzem apoptose através da ativação da via da MAP- quinases, especificamente por meio de JNK e p38. Dentre os agentes antitumorais que requerem ativação da JNK por citotoxicidade tem-se a cisplatina. A inibição da via de sinalização JNK, conduz à diminuição na apoptose induzida por cisplatina, enquanto que a sobre-expressão de c-jun aumenta a sensibilidade celular para a cisplatina (POTAPOVA et al.,1997).Em resumo, elevados níveis de GST estão associados com o incremento da resistência à apoptose iniciada por uma variedades de estímulos (KARTALOU; ESSIGMANN, 2001). Estes dados são consistentes com a GST atuando como inibidor da via MAP–quinase.

1.3.4 A IMPORTÂNCIA DA ELETROQUÍMICA NA QUIMIOTERAPIA

Nos últimos anos foiá incrementado o número de pacientes que são submetidos à quimioterapia. Dado a alta toxicidade destes fármacos precisa-se de ferramentas analíticas que permitam as análises de estes compostos citotóxicos com a finalidade de conseguir monitorá-los em sistemas ambientais, ou um objetivo mais ambicioso na

procura de conseguir estudar o metabolismo destes em pacientes ou profissionais expostos a estes compostos (NUSSBAUMER et al, 2011).

Os primeiros métodos desenvolvidos para monitorar estes fármacos estão baseados em cromatografia com detecção UV (LC-UV), espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas, espectroscopia Raman, cromatografia de gases, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) entre outras. (NUSSBAUMER et al, 2011). Estes métodos apresentam um bom desempenho para análises de amostras contendo elevadas concentrações. Porém, para baixas concentrações de agentes citotóxicos ou amostras complexas (biológicas ou meio ambientais), é necessário o tratamento da amostra, por exemplo, como um clean-up e pré-concentração, de forma tal, que a amostra possa ser analisada, além dos altos custos das análises e necessidade de pessoal qualificado, devido à complexidade dos equipamentos. (NUSSBAUMER et al. 2011).

Os métodos analíticos são muito importantes na oncologia para:

1. Controle de qualidade de formulações comercializadas;
2. Estudo de liberação controlada de fármacos;
3. Análises de agentes citotóxicos em amostras biológicas;
4. Desenvolvimento de novos fármacos e formulações;
5. Monitoramento do fármaco na terapia;
6. Monitoramento de profissionais da saúde expostos aos agentes citotóxicos;
7. Análises de agentes citotóxicos em amostras ambientais, águas residuais (os fármacos citotóxicos são excretados pela urina, além disto, não se tem um controle rígido dos resíduos hospitalares relacionados com estes fármacos).

Para cumprir com as funções mencionadas anteriormente, os métodos eletroquímicos nos últimos anos têm sido bem explorados através do uso de técnicas voltamétricas com grande diversidade de eletrodos modificados. De modo muito geral os conceitos básicos de sensores e biossensores eletroquímicos junto com alguns

exemplos, mostram que a eletroquímica apresenta-se como uma ótima ferramenta na quimioterapia.

1.3.4.1 SENSORES E BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS

Sensores e biossensores eletroquímicos têm apresentado extensas aplicações em diversas indústrias. Hoje em dia, muitos instrumentos analíticos utilizados no ambiente, alimentos, produtos farmacêuticos, também clínicas ou laboratórios e alguns dispositivos já comercializados point-of-care funcionam usando estes sensores.

É bem conhecido que o primeiro biossensor amperométrico para glicose foi desenvolvido por Clark empregando como enzima glicose oxidase fisicamente imobilizada em uma membrana de cuprofano (celulose recuperada), conforme mencionado por FATIBELLO; CAPELATO (1992). Desde então, os biossensores de glicose amplamente empregados em glicosímetros são um importante exemplo dos sensores eletroquímicos de sucesso.

Primeiramente, deve-se definir alguns termos empregados neste trabalho como, o que é um sensor e um biossensor? Que são eletrodos quimicamente modificados? Quais são as técnicas mais empregadas na detecção de fármacos?

FARIDBOD, GUPTA e ZAMANI (2011) denominaram como sensores eletroquímicos aos dispositivos que transformam informações eletroquímicas em um sinal analiticamente útil. Estes compostos possuem dois componentes básicos, um sistema de reconhecimento químico (molecular), que é a parte mais importante do sensor e um transdutor fisicoquímico. O transdutor é um dispositivo que converte a resposta química em um sinal que pode ser detectado por meio de instrumentação elétrica moderna. Estas duas partes formam um eletrodo de trabalho (sensor) que juntamente com o eletrodo de referência e o auxiliar formam o sistema eletroquímico. Por outro lado, FATIBELLO e CAPELATO (1992), definiram os biossensores como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpo, antígeno, organismos, tecidos animais e vegetal, células, organelas, etc.), conectado a um transdutor (qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um tipo de sinal

biológico em sinal elétrico. Uma das classificações dada aos sensores e biossensores é baseada no tipo de transdutor empregado.

Nos últimos anos, tem se intensificado o uso dos sensores voltamétricos os quais empregam técnicas voltamétricas (BATCHELOR-MCAULEY, 2012). A voltametria permite obter informações eletroquímicas de um ou vários analitos, através da medição da corrente em função do potencial aplicado. Vários tipos de experimentos podem ser realizados para reunir informações como voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e redissolução para citar algumas técnicas comuns. (KIMMEL et al, 2012).

A voltametria cíclica é uma das voltametrias mais amplamente empregadas, sendo muito útil para se obter informações sobre o potencial redox e reações eletroquímicas do analito de interesse. Neste caso, ocorre a varredura de potencial entre dois pontos de valores V_1 (inicial) e V_2 (final) com uma taxa fixa. No entanto, quando o potencial atinge V_2 a varredura é invertida e o potencial retorna para V_1. A velocidade de varredura, $\upsilon = (V_2-V_1)/(t_2-t_1)$, é um fator crítico, desde que a duração de uma varredura deve ser suficiente para permitir que a reação ocorra. O potencial medido entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, enquanto a corrente circula entre o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo. (GRIESHABER, D. *et al*.,2008).

Por outro lado, existem as técnicas de pulso, entre elas voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. Estas técnicas de pulso foram desenvolvidas inicialmente para o eletrodo de gota de mercúrio e consiste em aplicar um pulso de potencial, deste modo, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradáica, assim, a corrente é medida no final do pulso. Melhorando consideravelmente a sensibilidade do método, e consequentemente, o limite de detecção e de quantificação, por esta razão, são amplamente empregadas em análises farmacêuticas e detecção de traços de metais. (BRETT; BRETT, 1996; LOCATELLI, 2007).

Para análises de fármacos, a voltametria de redissolução adsortiva (AdSV) é muito popular, uma vez que permite obter baixos limites de detecção (alcançando quantidades na ordem de $\mu g\ L^{-1}$). Adicionalmente, destaca-se o relativo baixo custo de

instrumentação, quando comprado com outros métodos comumente empregados. Voltametria de redissolução adsortiva tem num primeiro passo uma pré-concentração na superfície do eletrodo, a qual é uma vantagem frente aos métodos voltamétricos convencionais. Para análises de traços de compostos orgânicos ou inorgânicos, o composto será acumulado na superfície do eletrodo de trabalho, seguido de um processo de oxidação (voltametria de redissolução anódica) ou por meio de redução (voltametria de redissolução catódica). As técnicas de redissolução empregam diferentes tipos de eletrodo de trabalho, por exemplo, eletrodo de gota de mercúrio (HMDE), gota de mercúrio estática (HMDE), eletrodo de platina, eletrodo de pasta de carbono (CPE), eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de cera impregnada (WIGE) ou eletrodo quimicamente modificado (CME), entre outros (EL-MAALI, 2004).

Materiais baseados em carbono na forma de grafite, carbono vítreo, diamante, etc. desempenham um papel muito importante no desenvolvimento de eletrodos sólidos por várias razões: (i) O carbono tem uma ótima superfície química e uma cinética de oxidação lenta do carbono, conduzindo assim a uma ampla faixa de potencial útil, especialmente em direção anódica. Esta é uma importante vantagem sobre os eletrodos metálicos. (ii) Eletrodos baseados em carbono exibem também as mais baixas correntes de fundo na região anódica. (iii) Além disso, possuem baixo custo, e estão disponíveis em uma ampla variedade de formatos (USLU; OZKAN, 2014).

Eletrodo quimicamente modificado é definido pela IUPAC, como um eletrodo feito de um material condutor ou semicondutor que é coberto com um filme monomolecular ou multimolecular, iônica ou polimérico, que por meio de reações faradáicas (transferência carga) ou diferentes potenciais interfaciais (sem transferência de carga) exibirá uma resposta na presença de uma sustância específica. Os processos no eletrodo quimicamente modificado (CME) não são puramente uma acumulação adsortiva, também pode ocorrer quimissorção, através de certas reações no CME sob condições controladas (EL-MAALI, 2004).

1.3.4.2 ELETROQUÍMICA NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Análise de fármacos é um importante ramo da química analítica, que tem um papel essencial no controle de qualidade. Além disso, seu monitoramento é importante para melhorar as doses terapêuticas em pacientes, e deste modo controlar os efeitos secundários, melhorando a eficácia do tratamento e a qualidade de vida do paciente. Em relação aos profissionais da saúde encarregados de administrar as doses terapêuticas e que são expostos a esses agentes antineoplásicos, pela inalação de aerossóis ou pós, ou por contato direto com a pele, a qual é considerada como a principal via de exposição, é evidente a importância do monitoramento contínuo nestas pessoas. Adicionalmente, desde a perspectiva do meio ambiente, necessita-se monitorar estes fármacos de ação anticancerígena dada sua alta toxicidade (SORSA; HEMMINKI; VAINIO, 1985; SORSA; ANDERSON, 1996; TURCI et al, 2006). Portanto, o desenvolvimento de um método sensível, simples, rápido, exato e confiável para determinação desta classe de princípios ativos é de grande importância e de interesse da saúde pública.

BAGHERI E HOSSEINI (2012) estudaram o comportamento eletroquímico e o mecanismo redox do raloxifeno (RLX) usado para prevenção de câncer de seio em mulheres pôs-menopáusica e osteoporoses na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE). A voltametria de pulso diferencial permite a detecção do RLX em amostras de plasma humano e formulações farmacêuticas. (BAGHERI, HOSSEINI, 2012).

Com o propósito de miniaturizar e obter sensores ou biossensores portáteis para monitoramento de fármacos, eletrodos impressos (SPEs) têm sido utilizados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção de vários compostos farmacêuticos. Isso por que, os SPEs apresentam caraterísticas vantajosas como possibilidade de portatibilidade, baixo custo, fabricação fácil e em grande escala, modificação versátil, e rápida detecção dos fármacos em diversas matrizes sem tratamento prévio da amostra, excelente limite de detecção, robustez, e, além disso, estes dispositivos estão destinados a análises de micro-volumes de amostra (de 20 – 100 µL) (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2015).

PRANJAL CHANDRA e colaboradores (2011) empregaram eletrodos impressos modificados com uma sonda de fita dupla de DNA (dsDNA) e cardiolipina (CL) para análises de alguns fármacos citotóxicos. O biossensor amperométrico permitiu a detecção simultânea de daunomicina (DAN), doxorubicina (DOX), idarubicina (IDA), e mitoxantrona (MIT), fazendo uso da propriedade das antraciclinas de interagir com o dsDNA de maneira estável por intercalação. Além disso, a adição do lipídeo aniônico CL permitiu a esses fármacos anticancerígenos interagir significativamente com este lipídeo na superfície do eletrodo.

No intuito de obter uma alta condutividade, sensibilidade e atividade eletrocatalítica no sensor, tem-se acrescentado aos sensores nanotubos de carbono (KARADAS et al., 2013; BARSAN; GHICA; BIETT, 2015; JACOBS; PEAIRS ; VENTON, 2010) e óxido de grafeno visando a detecção de fármacos citotóxicos. PATTAR e NANDIBEWOOR, (2015) desenvolveram um sensor para a determinação do fármaco 5- Flouroacil em amostras biológicas e formulações farmacêuticas. O sensor consiste em um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno e o biopolímero quitosana. O limite de detecção e quantificação obtido foi de 4,93 x 10^{-9} mol L^{-1} e 16,41 x 10^{-9} mol L^{-1} com a técnica de voltametria de onda quadrada e a faixa linear de resposta foi de 1,0 x 10^{-8} a 1,0 x 10^{-7} mol L^{-1}.

Com o propósito de melhorar a seletividade na detecção de fármacos e na busca de metodologias mais baratas e capazes de monitorar esses analitos em meios não fisiológicos, nos últimos anos têm sido desenvolvidos polímeros molecularmente impressos (MIP). O método consiste na polimerização de monómeros funcionais, na presença de moléculas molde e subsequente extração do molde a partir da matriz de polímero resultante, o que gera cavidades complementares em forma e tamanho com o analito usado como molde. FLOREA e colaboradores (2015) desenvolveram um polímero molecularmente impresso para a detecção de gemcitabina usando eletropolimerização do *p*-aminotiofenol com nanopartículas de ouro na superfície de um eletrodo de ouro sólido. Os autores obtiveram uma faixa linear de resposta de 3,8x10^{-15} mol L^{-1} - 38 x 10^{-9} mol L^{-1} e um limite de detecção de 3 x 10^{-15} mol L^{-1} .

1.3.4.3 ***ELETROQUÍMICA NO ESTUDO DE INTERAÇÕES COM FÁRMACOS QUIMIOTERÁPICOS***

As tecnologias empregando DNA, proteínas, lipídeos ou outras biomoléculas junto com a eletroquímica começaram a ser usadas amplamente nas áreas de diagnóstico; na procura pelo entendimento dos mecanismos de interação de fármacos empregados na quimioterapia; e para tentar explicar o metabolismo destes nos pacientes, uma vez que foi observado o grande potencial da eletroquímica como ferramenta para a busca de novos fármacos intercaladores do DNA ou de biomoléculas (SIQUEIRA et al., 2010; RAVERA et al., 2009; HARWOOD; POUTON, 2006). Neste sentido, CONGUR, ERDEM e MESE (2015), estudaram a interação entre a dupla fita de DNA (dsDNA) e o fármaco topotecan (TPT) mediante técnicas eletroquímicas modificando a superfície de um eletrodo baseado em barra de lápis de grafite (PGEs, do inglês, Pencil grafite electrode) modificado com nanotubos de carbono de parede única (SWCNT). O fármaco topotecan é amplamente usado na terapia contra o câncer de ovário e cervical. Por outro lado, YAPASAN e colaboradores (2010), estudaram a interação entre os fármacos cisdiaminodicloroplatina (II) e oxoliplatina com a fita dupla de DNA de timo de bezerro, empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV) e impedância eletroquímica (EIS), fazendo uso também de eletrodos de barra de grafite modificados com nanotubos de parede única (SWCNT-CE). Adicionalmente, Ibraim estudou a interação do fármaco nogalamicina com o DNA. O fármaco se intercala com o DNA inibindo a sínteses de RNA e deste modo exibe uma atividade antitumoral contra várias linhagens de células tumorais (IBRAIM, 2001). Outro exemplo é dado por Xue Tian e colaboradores, que analisaram os efeitos anticancerígenos de um alcaloide derivado de uma planta chinesa, berberine, usando um sensor de DNA imobilizado em um eletrodo de carbono vítreo (TIAN et al, 2008).

1.3.4.4. ***MONITORAMENTO DE FÁRMACOS ANTITUMORAIS EM CULTIVOS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS***

A possibilidade de utilização de instrumentos analíticos minimamente invasivos para monitoramento de células cancerosas e suas interações com diversos analitos proporciona grandes avanços na pesquisa do câncer. A eficácia no desenvolvimento de um sensor confiável para a monitorização de células depende da capacidade de conseguir instrumentação poderosa que irá facilitar a transdução de sinal mensurável do processo biológico que ocorre no ambiente celular. O sensor não deve afetar a viabilidade celular e deve funcionar bem no sistema e nas condições específicas impostas pela cultura de células. As técnicas para detecção de células cancerígenas são testes citológicos, imagens de fluorescência, detecção radioativa, citometria de fluxo entre outros. Estas técnicas envolvem processos complexos e alto custo na instrumentação (ANDREESCU; SADIK, 2005; WANG et al, 2012). Os biossensores eletroquímicos podem ser usados como um instrumento eficaz na pesquisa do câncer de células para o estudo de processos bioquímicos, desenvolvimento e progressão do câncer (LIU; QUIN; LI, 2013). Além disso, os biossensores fornecem ferramentas para o estudo de possíveis fármacos alvo, assim como informações importantes de mecanismos de moléculas relacionadas com apoptoses (HUNG et al, 2015). Por exemplo, Peng Miao e colaboradores, elaboraram um biossensor eletroquímico para monitoramento da apoptose de células cancerígenas por meio da modificação do eletrodo de ouro com o peptídeo FNFRLKAGAKIRFGRGC e AFGNRGGRAAKNFHARGC (sob patente, desenvolvido pelos autores). Os autores conseguiram avaliar estes sinais de apoptoses adicionando diversas concentrações de H_2O_2 (MIAO et al, 2014; ARNDT et al, 2004).

Com relação à detecção precoce de células resistentes aos fármacos (MDR), as quais são células cancerosas que se tornam resistentes ao tratamento, ou tem esta propriedade intrínseca, sua determinação precoce pode levar à melhoria do tratamento contra o câncer, superando assim problemas maiores como a mortalidade, uma vez que o tratamento poderia ser mudado a tempo. Sendo, imperativo e clinicamente significativo na fase inicial do tratamento. Isso ajudará os médicos a desenvolver

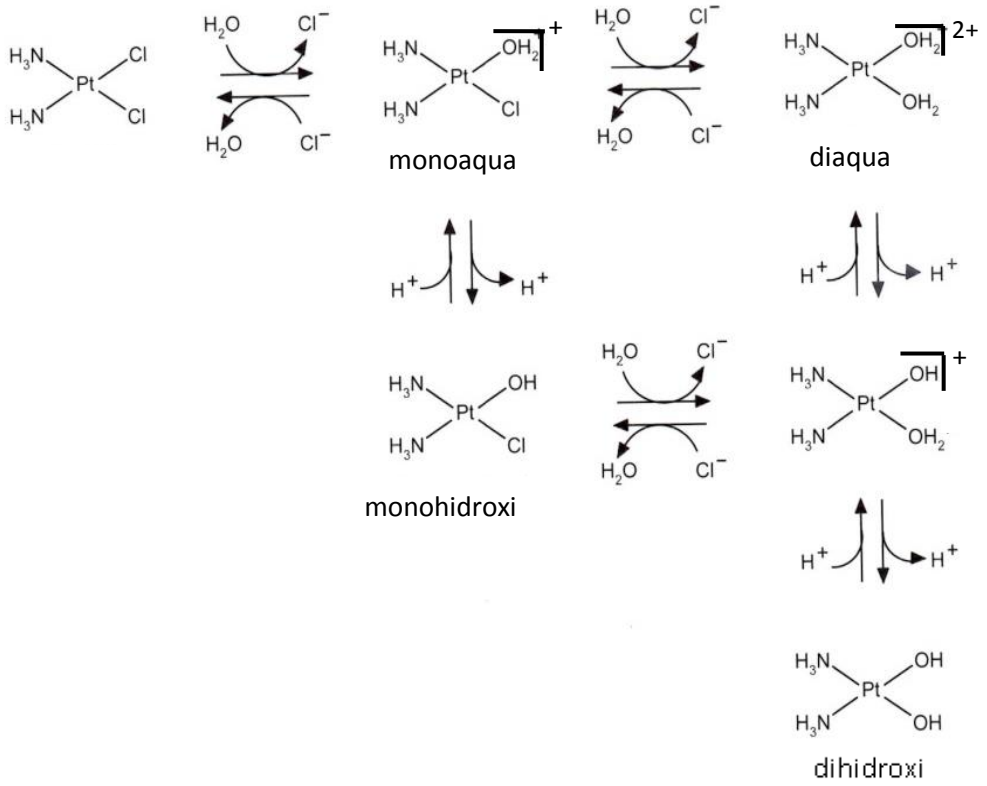
estratégias terapêuticas alternativas para pacientes com câncer. CHANDRA e colaboradores desenvolveram um immunosensor amperométrico para detecção de células resistentes a fármacos através da detecção de P-gp. O immunosensor foi fabricado através da formação de ligações covalentes entre anti-P-gp e o grupo carboxílico da camada do composto 3-aminofenil ácido borônico (APBA), e eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro. O faixa linear de detecção de células cancerígenas foi entre 50 e 100,000 celulas / mL com limite de detecção de 23 ±2 celulas / mL (CHANDRA et al., 2015).

1.3.4.5. ***QUÍMICA E ELETROQUÍMICA DA CISPLATINA E SEUS ANÁLOGOS***

O foco desta pesquisa é o fármaco antitumoral cisplatina, que é amplamente usado para o tratamento de diversos tumores sólidos, particularmente os da cabeça, pescoço, bexiga, ovários, testículos, pulmão e ossos (RILEY C.M, 1988). O fármaco cisplatina é o isômero geométrico de configuração cis do complexo planar-quadrado $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$; o seu isômero de configuração trans não é biologicamente ativo. Cisplatina é um agente citotóxico que sofre hidrólise. A reação com H_2O resulta em sua ativação, pela formação de íons monoaqua e diaqua, espécies que são 10-70 vezes mais reativos que a espécie neutra. Em uma solução aquosa, a cisplatina simplesmente troca um ou dois Cl^- por H_2O, e os aqua íons podem ser neutralizados pela perda de prótons (Figura 10), resultando na inativação do complexo. Em tampão fosfato, esse processo segue uma cinética de primeira ordem, com a cisplatina possuindo tempo de meia-vida de 2 horas. O primeiro produto formado é uma espécie monoaqua, o qual é um íon positivo com um valor de pKa 6,6, o que significa que espécies monohidroxi predominam em pH fisiológico. O segundo cloreto pode ser trocado, a constante de equilíbrio para este fenômeno sendo 30 vezes menor que o primeiro. Esta reação leva à espécies diaqua, formando um íon duplamente carregado com um valor de pKa entre 5,6-5,9 para a primeira deprotonação, e 7,3- 7,8 para a segunda desprotonação, formando espécies dihidroxi. Essas espécies catiônicas são de relevante importância na farmacodinâmica, devido a sua capacidade de diminuir o pH intracelular no tumor, incrementando sua citotoxicidade. DZAMITIKA e

colaboradores mostraram que formas hidratadas de cisplatina (H_2O-Pt) se acumulam rapidamente em cultura de células K562 (leucemia mielóide crônica) e GLC4 (carcinoma de pulmão), em comparação à cisplatina, que toma longo tempo (24 h) (DZAMITIKA, S. *et al*., 2006). *In vivo*, a velocidade da hidrólise da cisplatina depende da concentração de íons cloreto: o nível extracelular é de 0.1 mol L^{-1}, mas no meio intracelular é de 5 a 25 vezes mais baixas, o qual possibilita a formação de uma maior quantidade de espécies ativas aqua/hidroxi dentro da célula, que irão se ligar covalentemente aos sítios nucleofílicos do DNA, e especialmente N(7) da adenina e guanina, formando adutos DNA-cisplatina. Em soro humano a 37^o C, a cisplatina apresenta um tempo de meia-vida de 1,3 horas. As análises cinéticas mostram maior composição de espécies hidratadas ($t_{1/2}$ de 3,4 horas) (TESTA; JOACHIM; MAYER, 2003).

Figura 10: Mecanismo de hidrólises do fármaco cisplatina.



A eletrofilicidade da cisplatina é responsável também por reações com outros endógenos nucleófilos de baixo ou alto peso molecular, principalmente em baixas concentrações de íons cloreto. Nessas condições, a cisplatina pode se ligar covalentemente aos grupos SH das proteínas. Assim, ela liga-se fortemente à albumina glutationa e à globulina, que são proteínas de grande relevância clínica. A ligação da cisplatina com albumina e globulina é 9 a 16 vezes mais rápida que em relação à glutationa, e as ligações são irreversíveis, o que leva à inativação do quimioterápico. As ligações da cisplatina com a albumina persistem em pacientes curados que foram tratados com o fármaco. Na presença da albumina e da globulina, o tempo de meia-vida das espécies catiônicas da cisplatina é reduzido ($t_{1/2}$ de 2,1 horas) mais rapidamente do que na presença de glutationa ($t_{½}$ de 2,4 horas) (TESTA; JOACHIM; MAYER, 2003). Em comparação com outros fármacos à base de platina, Hagrman e colaboradores mostraram que as reações iniciais de GSH com oxaliplatina e cisplatina são de taxas similares, mas, por outro lado, a carboplatina reage a um ritmo mais lento. (HAGRMAN; GOODISMAN; SOUID, 2004).

Técnicas analíticas convencionais têm sido desenvolvidas para a determinação de cisplatina, sendo estas baseadas na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é o método mais amplamente usado (VERSCHRAAGEN et al., 2002). Outras técnicas como espectrometria de emissão atômica com Plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (YE et al, 2014), Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (HOPTER et al, 1989), bioensaios (KARGARLOO, 2004), são outras técnicas descritas na literatura, porém apresentam alto custo de análise e a necessidade de especialistas altamente qualificados para realizá-las (YE et al, 2014) (BOSCH et al., 2008).

Para nosso conhecimento, a detecção eletroquímica de cisplatina foi relatada em um estudo *in vitro* em meio de cultura (BERNARD et al, 2011); Para tal, metalotioneína e as enzimas glutationa-S-transferase, que são responsáveis pela eliminação de compostos xenobióticos no organismo (BERNARD et al, 2011), foram imobilizadas respectivamente, em elétrodos de mercúrio (PETRLOVA et al, 2006)) e de pasta de carbono para a detecção e quantificação deste composto (MATERÓN et al, 2014).

KRIZKOVA e colaboradores (2010) usaram a técnica de voltametria de pulso diferencial com redissolução adsortiva acoplada à reação de Brdicka (AdDPV-Brdicka reaction) para estudar as interações da proteína metalotioneína com a cisplatina e carboplatina. DOSPIVOVA e colaboradores (2012), empregaram a técnica de voltametria de pulso diferencial para a detecção de adutos formados por $PtCl_2$ e cisplatina com o DNA. O eletrodo usado foi eletrodo de gota de mercúrio (HMDE), obtendo um limite de detecção de 1,0 x 10^{-12} e 3,0 x 10^{-9} mol L^{-1} para $PtCl_2$ e cisplatina, respetivamente. Além disso, tem sido relatado o desenvolvimento de outros sensores eletroquímicos, pela utilização de eletrodos de carbono vítreo modificados com óxido de grafeno/nanotubos de carbono de paredes múltiplas (YE et al. 2014), e eletrodo de pasta de carbono modificado com prata eletrodepositada empregando técnica de voltametria de redissolução anódica em voltametria cíclica, obtendo limite de detecção 3,2 x 10^{-9} mol L^{-1} (HERNANDEZ-SANTOS; GONZÁLES-GARCÍA; COSTA- GARCIA, 2005).

Desta forma, pelo exposto em relação à importância da quantificação e monitoramento de quimioterápicos, a conhecida versatilidade dos métodos eletroanalíticos e a carência de informação na literatura de métodos de análise que explore a transdução eletroquímica no monitoramento de quimioterápicos, esta tese de doutorado visa contribuir com o desenvolvimento de sistemas de análises sensíveis e seletivos para o fármaco cisplatina, usando um biossensor baseado em resposta inibitória a partir da atividade enzimática da enzima GST e um sensor não enzimático usando eletrodos impressos modificados com nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxila e surfactante aniônico (SDS) .

2 OBJETIVO

Dsenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos para detecção do fármaco cisplatina baseados em eletrodos de carbono, para aplicações em amostras biológicas, visando mostrar a importância da eletroquímica no monitoramento de composto antitumorais usados no tratamento de câncer.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A glutationa-s-transferase de fígado de equino (GST), NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4, glutationa reduzida, *cis*-diaminocloro platina (II), *cis*-diaminodicloro platina (II), pirarubicina, cloridrato de gemcitabina, carboplatina, oxaliplatina, cloridrato de doxorrubicina, cloreto de potássio, glutaraldeído, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), dodecilssulfato de sódio (SDS), cloreto de sódio e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Loius, MO, EUA).

No biossensor, o eletrolito suporte foi solução tampão fosfato de concentração de 5,0 $x10^{-2}$ mol L^{-1}(pH 6,5), o qual foi preparado por uma mistura de NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4. Glutaraldeído (25% v/v) foi diluído em tampão fosfato (pH 6,5) para obter uma solução final de concentração 5,0 $x10^{-2}$ mol L^{-1}. As soluções de GSH e GST foram preparadas no tampão fosfato, sendo a concentração estoque de GST de 62,5 U mL^{-1} e armazenada a -20 °C. No sensor, o eletrolito suporte foi cloreto de sodio (NaCl) 0, 1 mol L^{-1} (pH 7,0).

Soluções de 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} de *cis*-diaminodicloro platina (II) foram preparadas em 0,1 mol L^{-1} NaCl para o sensor e em água ultra-pura (milli Q) para o biossensor. Para tal, foram pesados 7,4 mg do composto e dissolvidos em 25,0 mL de 0,1 mol L^{-1} de NaCl. Os outros fármacos foram dissolvidos em água ultra-pura.

3.2 PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA

Diferentes tipos de imobilização foram realizados: adsorção física, ligação covalente com CDI (1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida) (TABOADA et al., 2001), e ligação cruzada com glutaraldeído; assim como foram realizados experimentos com a enzima em solução; obtendo-se os melhores resultados para a

imobilização com glutaraldeído. A seguir, foram estudadas as diferentes proporções de glutaraldeído (0,5 - 5 % na pasta), obtendo-se melhores resultados com 0,5% de glutaraldeído, uma vez que houve menor diminuição do sinal de corrente e ausência de lixiviação da enzima. Adicionalmente, realizaram-se estudos com diferentes mediadores como TCNQ (7,7,8,8 tetracianoquinodimetano), ferroceno, e a ftalocianina de cobalto não se obtendo resultados satisfatórios.

A preparação do biossensor foi realizada por meio de ligação covalente cruzada da enzima por reagente bifuncional (glutaraldeído). A pasta de carbono foi preparada homogeneizando 100 mg de pó de grafite (Fluka) tamanho de partícula < 0,1 mm, uma concentração final de 2,5 mg mL^{-1} de enzima GST e 0,5% de glutaraldeído (m/v), preparados em tampão fosfato (pH 6,5 e 5×10^{-2} mol L^{-1}) em um volume total de 400 µL. A mistura foi deixada reagir a 4 ^{o}C por 24 h e após este período, ao material seco foram adicionados 50 µL de óleo mineral. A pasta de carbono modificada com a enzima GST, foi colocada dentro da cavidade do eletrodo comercial de pasta de carbono a ser descrito a seguir.

3.3 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

3.3.1 BIOSSENSOR

Medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostato da Palmsense® em temperatura ambiente, utilizando-se uma cela eletroquímica composta por 3 eletrodos: eletrodo de pasta de carbono (3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade) adquirido da industria Basi® como eletrodo de trabalho, fio de Pt que foi utilizado como contra-eletrodo e um eletrodo de Ag/AgCl/K (KCl_{sat}) 3 mol L^{-1} como eletrodo de referência.

3.3.1.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas eletroquímicas do biossensor a base da enzima GST foram realizadas em uma cela eletroquímica contendo 5 ml de solução tampão fosfato em

concentração 0,05 mol L^{-1} (pH 6,5), em um intervalo de potencial de -0,6 a 0,6 V *vs* Ag/AgCl (KCl_{sat}), a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}.

3.3.1.2 VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA E PULSO DIFERENCIAL

A resposta do biossensor foi avaliado mediante a adição do fármaco cisplatina e quatro fármacos citotóxicos (gemcitabine, carboplatina, oxaliplatina, doxorubicina). Os parâmetros foram otimizados usando a técnica de VOQ e VPD, usando uma céla eletroquimica contendo 5 ml de 0,005 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5), em um intervalo de potencial de -0,6 a 0,6 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Condições de análise para VPD: tempo de modulação de 0,05 s, amplitude de 75 mV e degrau de potencial de 5 mV; para VOQ: frequência de 10 Hz, amplitude de 75 mV e degrau de potencial de 5 mV.

.

3.3.2 SENSOR IMPRESSO

Todas as medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas utilizando um potenciostato modelo micro-Autolab tipo III (Autolab / Eco Chemie®), equipado com uma célula eletroquímica contendo o eletrodo impresso (DropSense® DRP-110CNT). O sistema de SPE (*screen-printed electrode*) era composto de um eletrodo de referência de prata, um contra eletrodo de grafite e um eletrodo de trabalho modificado Com MWCNT-COOH (3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura).

3.3.2.1 VOLTAMETRIA CICLICA

As respostas do sensor *MWCNT-COOH/SDS/SPE* e do sensor impresso não modificado foram avaliadas usando 0,1 mol L^{-1} de NaCl (pH 7,0), como eletrólito de suporte, em um intervalo de potencial de -0,8 a 0,5 V *vs* Ag/AgCl (KCl_{sat}) a 20 mV s^{-1}.

3.3.2.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

A resposta do sensor *MWCNT-COOH/SDS/SPE* foi avaliada mediante a adição do fármaco cisplatina e quatro fármacos citotóxicos (gemcitabine, carboplatina, oxaliplatina, doxorubicina) usando voltametria de pulso diferencial no intervalo de potencial de -0,8 a 0,1 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), tempo de modulação de 0,05 s, amplitude de 75 mV, incremento de 8 mV, potencial de acumulação de -0,5 V e tempo de acumulação de 50 s.

3.4 MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

A reação catalisada por GST entre CDNB e GSH produz GS-DCNB, que é um dinitrofeniltioéter que absorve em comprimento de onda de 340 nm. Assim, o aduto foi detectado por um espectrofotômetro (Agilent 8453A) usando um leitor de microplacas SpectraMax multi-modo M3. A temperatura foi fixada em 37 °C e a cinética da reação foi monitorada durante 30 min.

3.5 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

Medidas de impedância foram realizadas com o potenciostato/galvanostato (EG&G PAR modelo 273) conectado a um analisador de resposta de frequência (Solartron modelo SI 1255), controlado com o software de impedância eletroquímica, modelo 398, versão 1.26 da Princeton Applied Research®.

3.6 ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA

Foram realizados com a colaboração do professor Reinaldo Marchetto através do uso de um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com compartimentos de amostra termostatizados. Nas medidas por fluorescência foi usada uma célula de quartzo de 1,5 mL e 1,0 cm de caminho óptico. A temperatura de análise foi de 37 ^{o}C.

3.7. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (TRANSFORMADA DE FOURIER)

Os espectros de infravermelho foram registrados em um aparelho Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR System, na região de 4000-400 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}. Os espectros foram obtidos por transmitância, utilizando a técnica de pastilhamento com KBr. As pastilhas foram confeccionadas usando uma prensa Perkin-Elmer (7 toneladas), diluindo a amostra de interesse em KBr, na proporção de 1:100.

3.8. ESTUDO DA SELETIVIDADE DO BIOSSENSOR

A seletividade do biossensor proposto foi avaliada a partir da resposta para quatro drogas antitumorais diferentes da cisplatina: cloridrato de gemcitabina, carboplatina, oxaliplatina, cloridrato de doxorrubicina; utilizando voltametria de pulso diferencial (DPV) na faixa de potencial de -0,8 a 0,1 V *vs* Ag|AgCl, KCl saturado. Os paramétros otimizados foram: degrau de potencial 8 mV, amplitude 75 mV, tempo de modulação 0,05 s e intervalo de tempo 0,5 s.

3.9. APLICAÇÃO DO SENSOR IMPRESSO UTILIZANDO AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

O sensor impresso foi avaliado utilizando amostras enriquecidas de soro biológico coletado de pessoas aparentemente saudáveis. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas e o sobrenadante contendo o soro foi recolhido e armazenado a uma temperatura de -4 °C. Para a preparação das amostras, o soro foi diluído 100 vezes em solução de NaCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7) e enriquecido com 1,5 x 10^{-5} mol L^{-1} de cisplatina (PETRLOVA et al, 2006). As recuperações de cisplatina foram calculadas após quantificação do fármaco nas amostras, utilizando o método da adição de padrão.

3.10. ANÁLISE EM HPLC DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® modelo 20A, acoplado a um detector UV SPD-20A/Vis, um amostrador automático SIL-20A e um desgaseificador DGU-20A5. O sistema de cromatografia foi controlado por um microprocessador e uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) foi utilizada na análise. As condições cromatográficas foram: fase móvel constituída por uma mistura de metanol e água deionizada (80:20, v/v), fluxo de 1,0 mL min^{-1}, volume de injeção de 10 µL da amostra e comprimento de onda de 254 nm (TEZCANA, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE CISPLATINA BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DA GST EM PASTA DE CARBONO

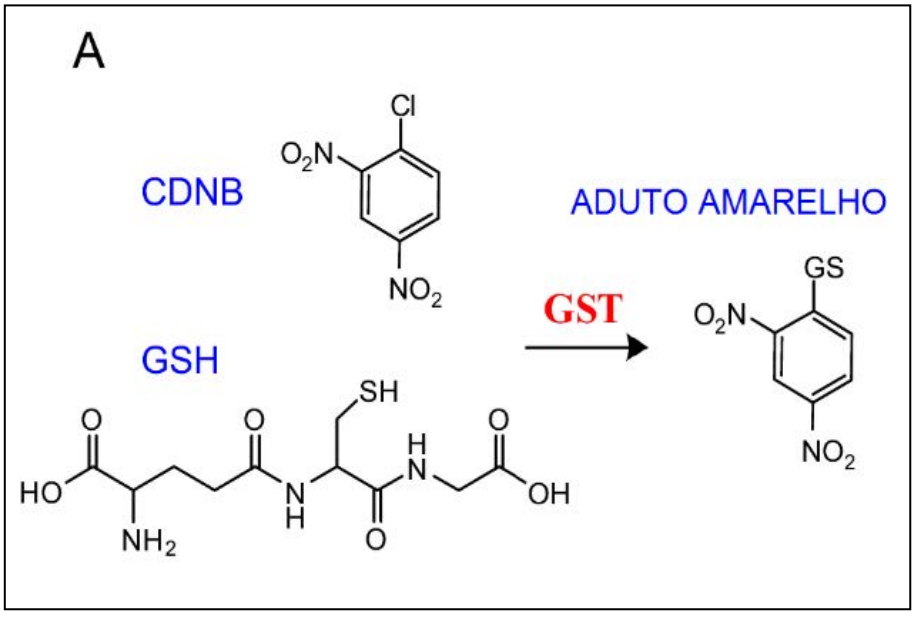
4.1.1 ESTUDOS PRELIMINARES EM ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

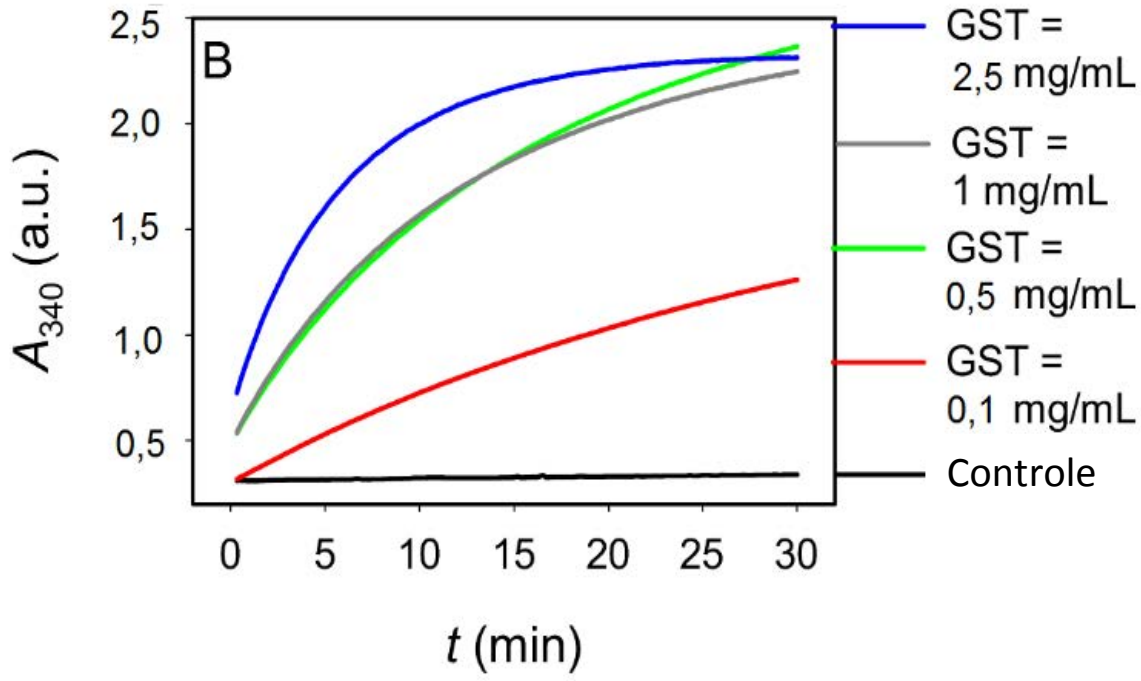
É conhecido que o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reage com a GSH reduzida para produzir um tioéter dinitrofenilo, o qual é um produto de cor amarela (JOHANSSON; RIDDERSTRÔM; MANNERVIK, 2000). Esta reação é catalisada pela GST (Figura 11A). O aduto CDNB-GS tem um pico de absorção em 340 nm que aumenta conforme a reação se processa. A absorbância da mistura de CDNB junto com GSH permaneceu bastante estável na ausência de GST (linha preta, a Figura 11B). Uma mudança de cor foi observada lentamente na presença de pequena concentração de GST (linha vermelha) e a velocidade da reação aumentou com o aumento da concentração da GST. Portanto, este resultado confirmou que o composto CDNB pode ser usado como substrato para o ensaio de atividade da gst (ZABLOTOWICZ et al, 1995). A seguir, determinou-se em estudos posteriores que a concentração ótima de GST sería de 2,5 mg mL^{-1}, uma vez que nesta concentração a

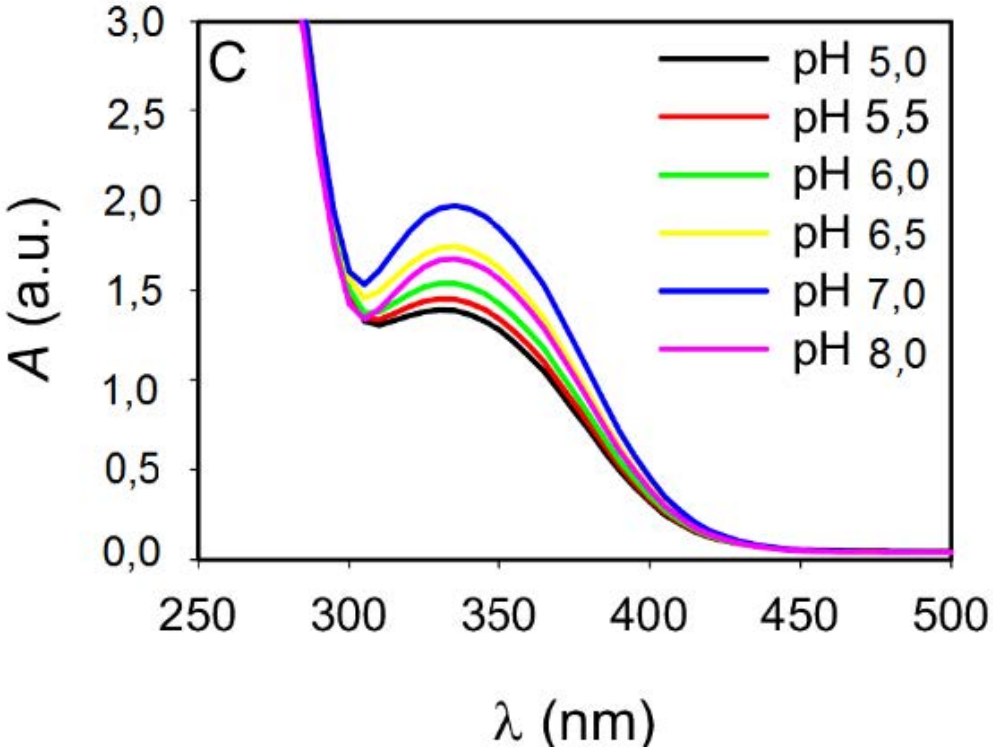
GST produz uma mudança de cor rápida, em aproximadamente 10 min, obtendo-se quase 95% da resposta de saturação. Este estudo também sugere que a determinação da interação de CDNB com a enzima pode ser monitorada por sensores ópticos.

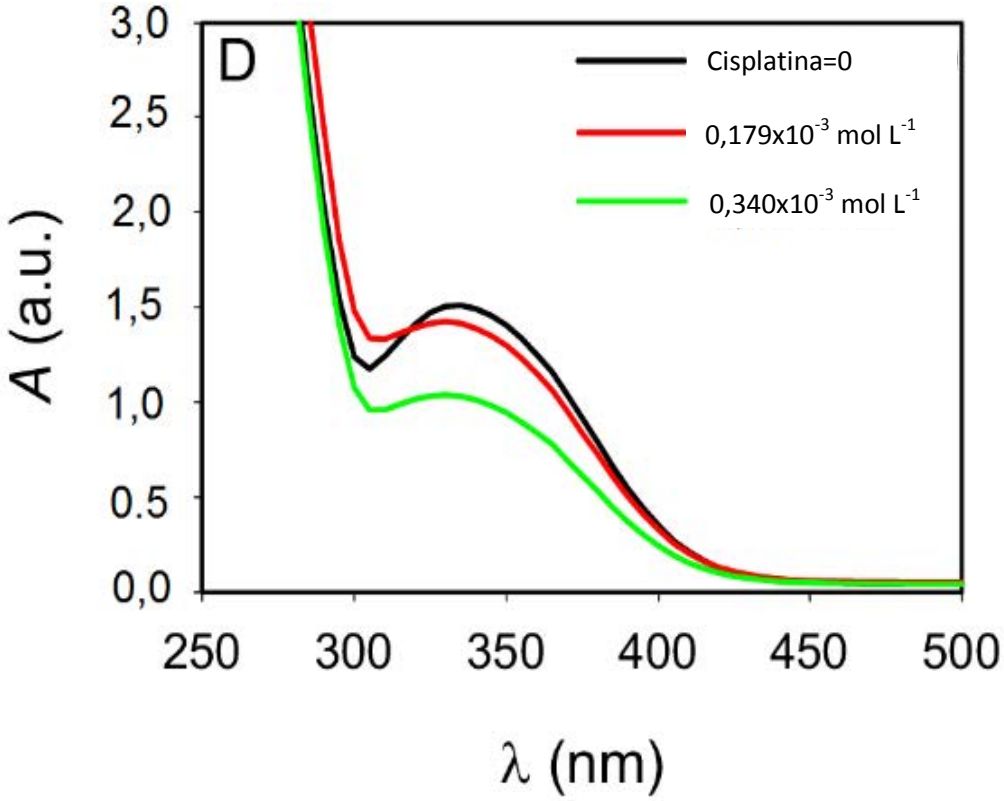
A seguir foi otimizado o pH que permitiria a maior atividade enzimática, sendo encontrado o valor de 6,5, no qual observa-se a maior atividade da enzima, conforme os resultados obtidos pela espectrofotometria (Figura 11C).

Figura 11: (A) reação catalisada por GST entre GSH e CDNB, gerando um aduto de cor amarela. (B) absorbância a 340 nm da reação entre CDNB e GSH na presença de diversas quantidades de GST. A reação foi realizada em tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 6,5) a 37 ºC. A linha de controle não contém GST (linha preta). (C) Otimização do pH para a reação catalisada por GST. (D) Perfil da inibição espectrofotométrica da reação enzimática na presença do fármaco cisplatina.




B
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
A_{340} (a.u.)
0
5
10
15
20
25
30
t (min)
GST = 2,5 mg/mL
GST = 1 mg/mL
GST = 0,5 mg/mL
GST = 0,1 mg/mL
Controle


C
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
A (a.u.)
250
300
350
400
450
500
λ (nm)
pH 5,0
pH 5,5
pH 6,0
pH 6,5
pH 7,0
pH 8,0



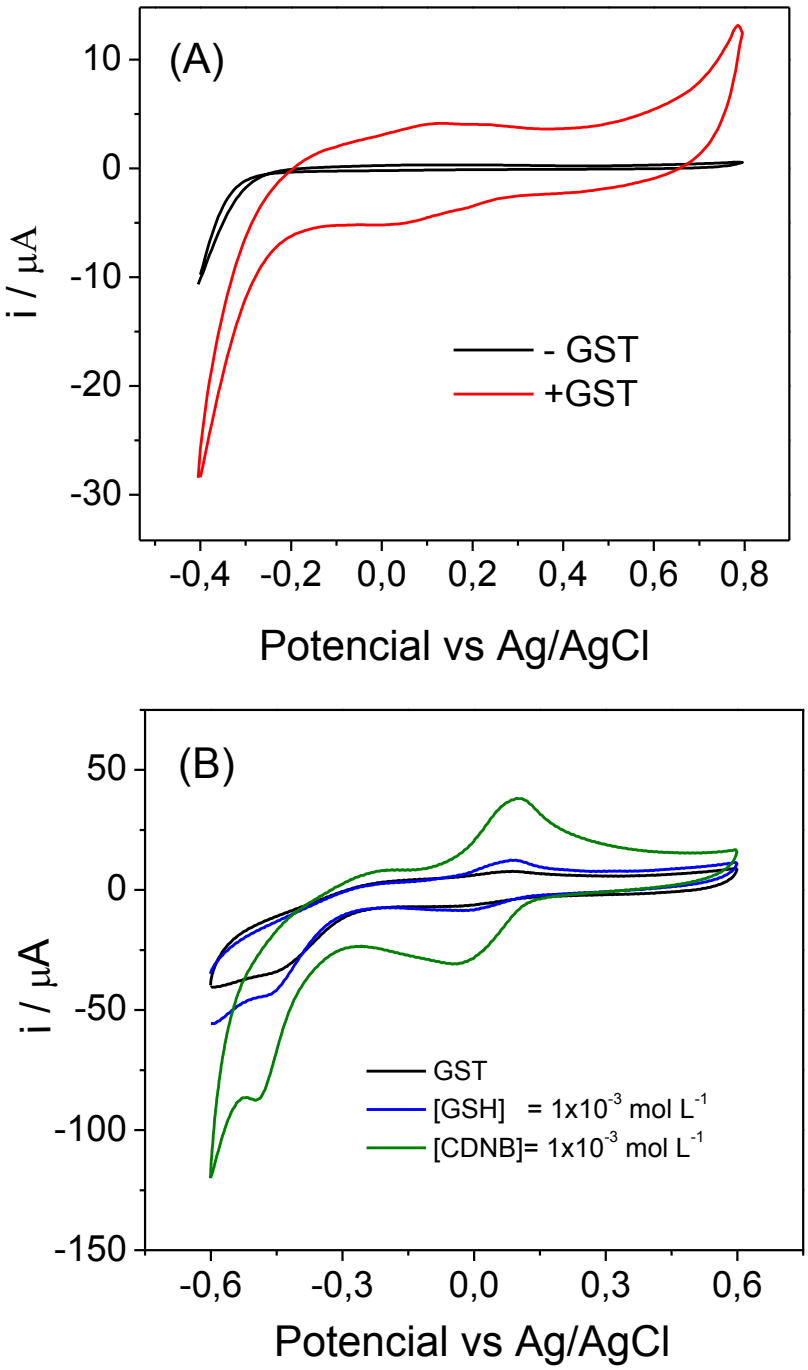
Como já descrito anteriormente a cisplatina é o fármaco quimioterápico mais utilizado no tratamento do câncer, e por tal razão, foi empregada como molécula modelo nesta tese. Baseados nos estudos espectrofotométricos anteriores, verificou-se que na presença da cisplatina, a intensidade do pico a 340 nm, diminui com o aumento da concentração do fármaco (Figura 11D). Isso sugere que, a cisplatina inibe a reação catalítica que produz o aduto colorido. Isto pode ser atribuído à competição entre cisplatina e CDNB na reação enzimática. A GSH reage inicialmente com CDNB e após adição de cisplatina, observa-se que o sinal diminui por causa da competição entre CDNB e cisplatina. Portanto, a inibição desta reação pode ser útil para a detecção de cisplatina. Porém, detecção espectrofotométrica, em análises de rotina de amostras biológicas, seria menos versáteis e muito caras, uma vez que a enzima estaria sendo usada na forma solubilizada. Adicionalmente, cabe ressaltar que alguns destes

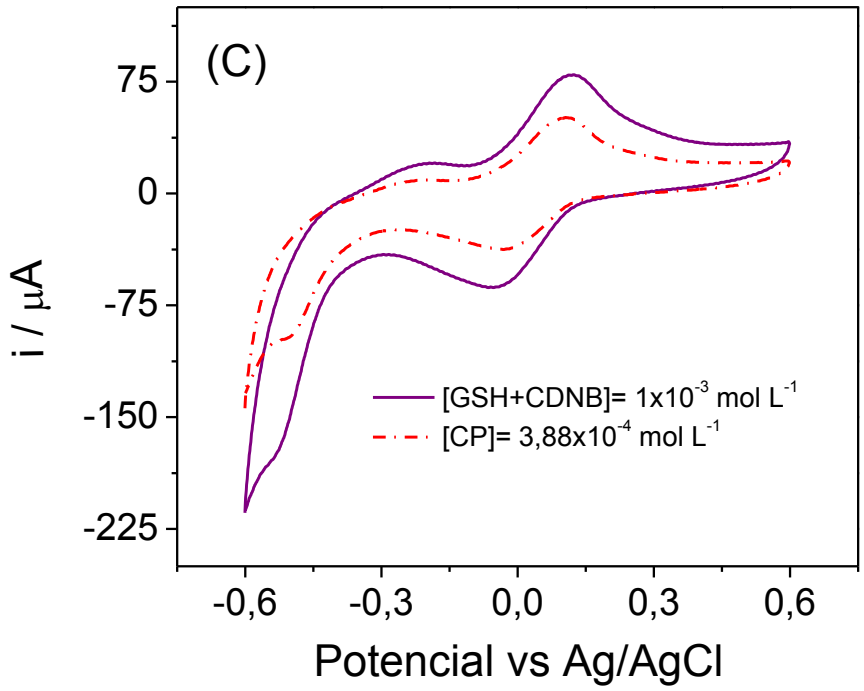
fármacos possuem coloração, assim como no caso do sangue ou urina, pelo qual haveria um grande efeito de matriz em medidas de absorbância. Por esta razão, o desenvolvimento de biossensores com transdução eletroquímica, que monitorem a resposta de algum dos reagentes ou produtos dessa reação enzimática, apresenta-se como sendo a melhor alternativa.

4.1.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM GST NA PRESENÇA DE CISPLATINA

Para construir o biossensor, ao contrário do que ocorre nos experimentos espectrofotométricos, a enzima GST encontra-se imobilizada. Para verificar a eficácia da imobilização da GST, análises com voltametria cíclica foram realizadas na ausência e na presença de GST (Figura 12A). A quantidade de GST utilizada na modificação da pasta de carbono foi baseada nos resultados dos experimentos espectrofotométricos da Figura 12 (onde 2,5 mg mL^{-1} de enzima equivale a 62,5 U mL^{-1}). Os substratos da GST, a GSH e o CDNB, foram adicionados na concentração de 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} na cela de medida. Para efeito de comparação foi preparado um eletrodo de pasta de carbono sem modificar o qual não apresentou nenhum pico redox (Figura 12A). O biossensor (eletrodo modificado com GST) mostrou uma maior corrente capacitiva com um pico de oxidação em 0,15 V e um pico de redução em 0,05 V *vs* Ag|AgCl,KCl 3 mol L^{-1}, indicando uma modificação da GST na pasta de carbono. O aumento da corrente capacitiva foi atribuído à imobilização de GST que foi reticulada na matriz de grafite por glutaraldeído.

Figura 12: (A) Voltamogramas cíclicos da pasta de carbono sem modificar (-GST) e modificada com GST (+GST). Voltametria cíclica na faixa de potenciais entre -0,4 e 0,8 V em 0,05 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,5) para a pasta de carbono modificada com GST mostrando resposta individuais dos substratos GSH e CDNB (B) e resposta de inibição na presença de cisplatina(C). Medidas realizadas em eletrólito suporte de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} a uma velocidade de varredura de 0,1 V s^{-1}.





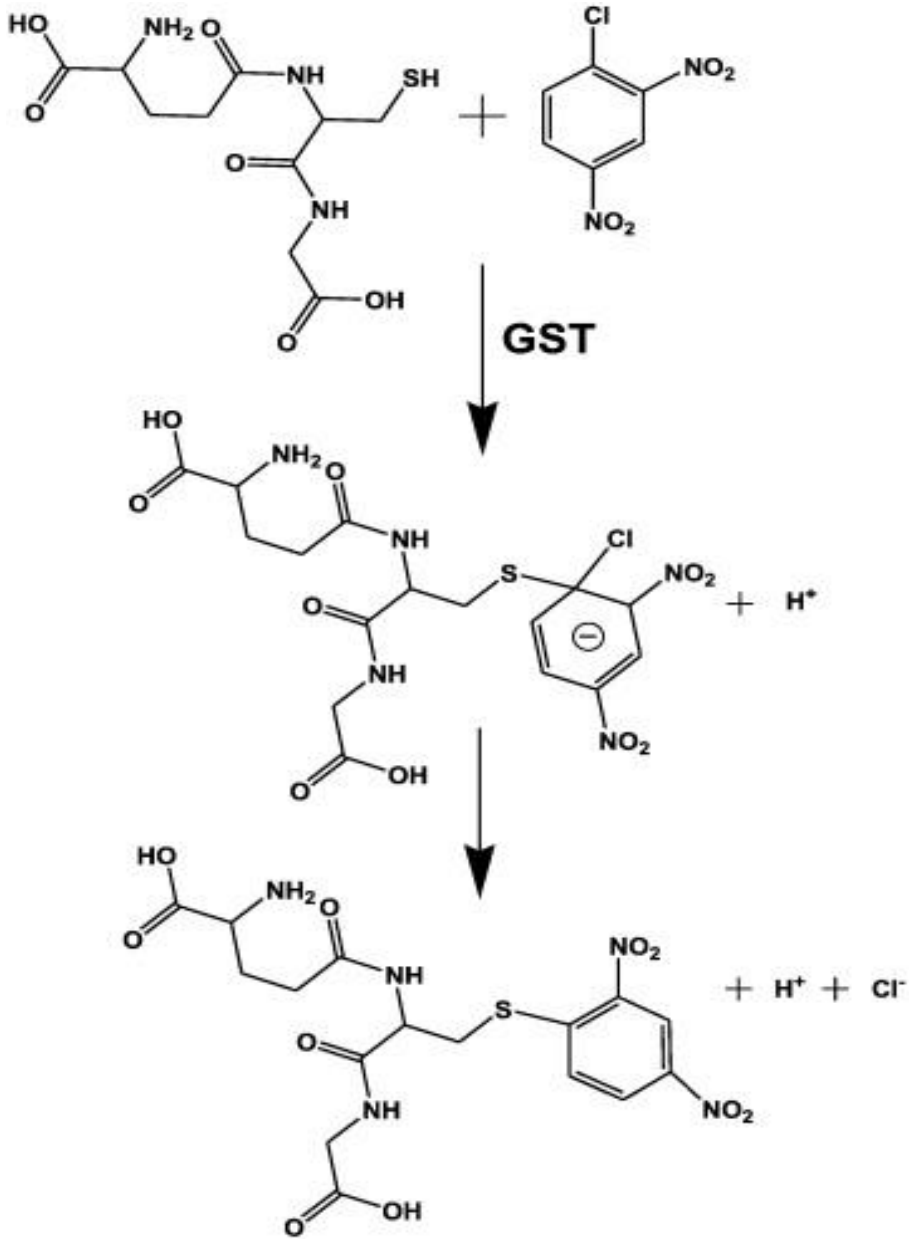
Após a confirmação da imobilização, foi avaliada a resposta do biossensor seguindo algumas etapas experimentais. O voltamograma cíclico inicial representa o biossensor em eletrólito suporte (curva em preto). Note-se que a escala no eixo-y é diferente para as Figuras 12B e 12C. Quando adicionado 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} de GSH (curva em azul na Figura 12B) o voltamograma mostra um pequeno aumento da corrente de pico anódica (i_{pa}). Esta corrente é atribuída à conversão entre GSSG (forma oxidada) e de GSH (forma reduzida) do substrato. Na presença de CDNB 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (curva verde), a corrente de pico aumentaram significativamente.

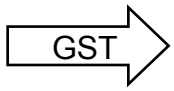
Na figura 12C foram adicionados simultaneamente ambos os substratos da enzima, GSH e CDNB. A reação enzimática se processou de forma mais eficiente (curva roxa); indicando que os sítios ativos da enzima foram ocupados por ambos os substratos, o que favorece a catálise enzimática (HABIG, W. H., 1974). Com a adição de 3,9 x 10^{-4} mol L^{-1} de cisplatina, foi observada a diminuição da corrente, devido ao efeito de inibição (curva vermelha pontilhada). Mostrando que a cisplatina poderia ser monitorada e quantificada pelo sensor à base de GST, tal como sugerido pelos experimentos espectrofotométricos. Assim a resposta do biossensor se baseia na

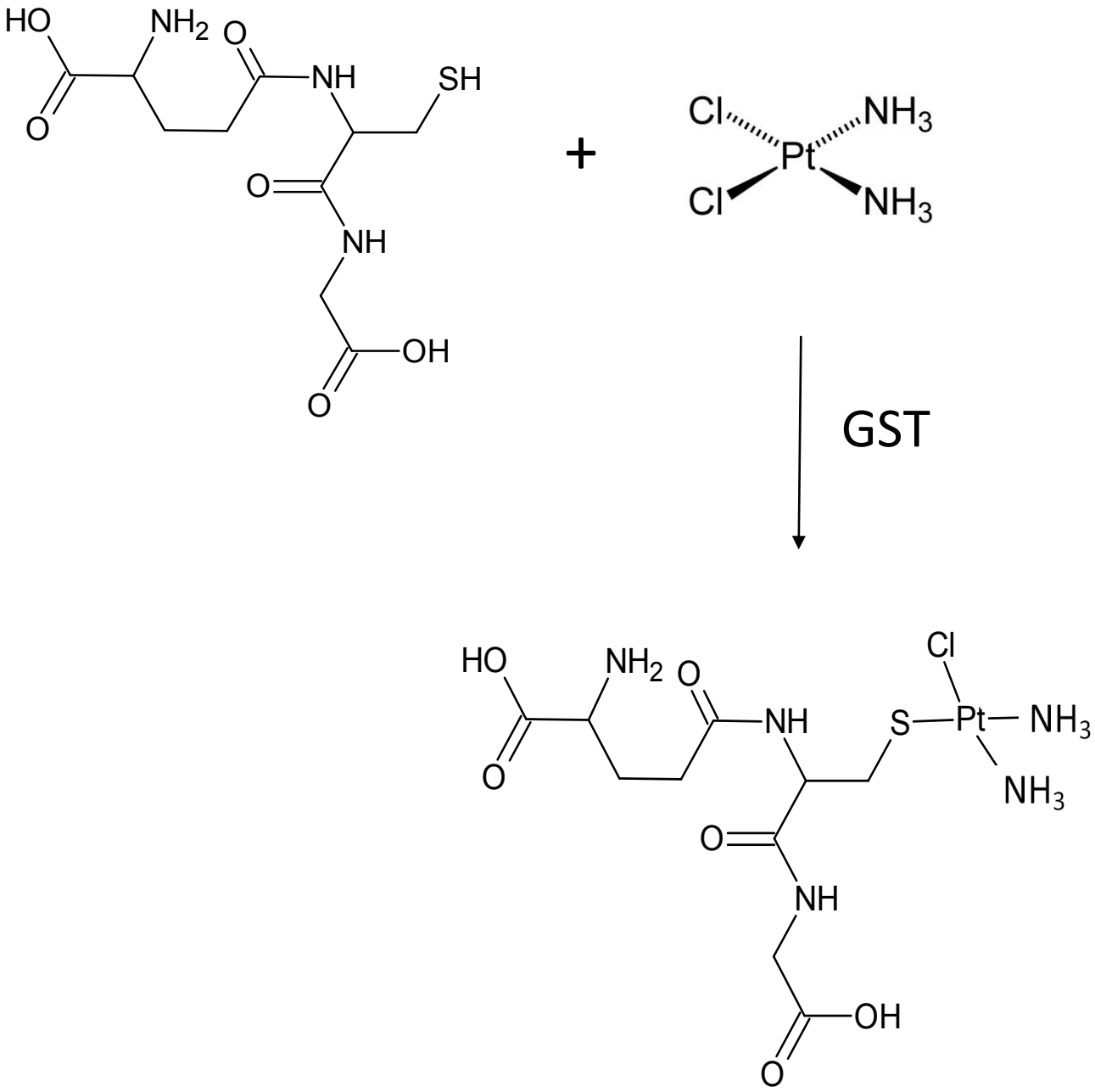
ligação de deslocamento e inativação da enzima na presença do fármaco, tal como mostrado pelas reações 1 e 2:

Reação (1) GST catalisando a conjugação de GSH com CDNB. (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT , 2015) (2) GST catalisando reação de conjugação entre o fármaco cisplatina e GSH.

GSH + CDNB $\xrightarrow{\text{GST}}$ GSDNB Reação (1)

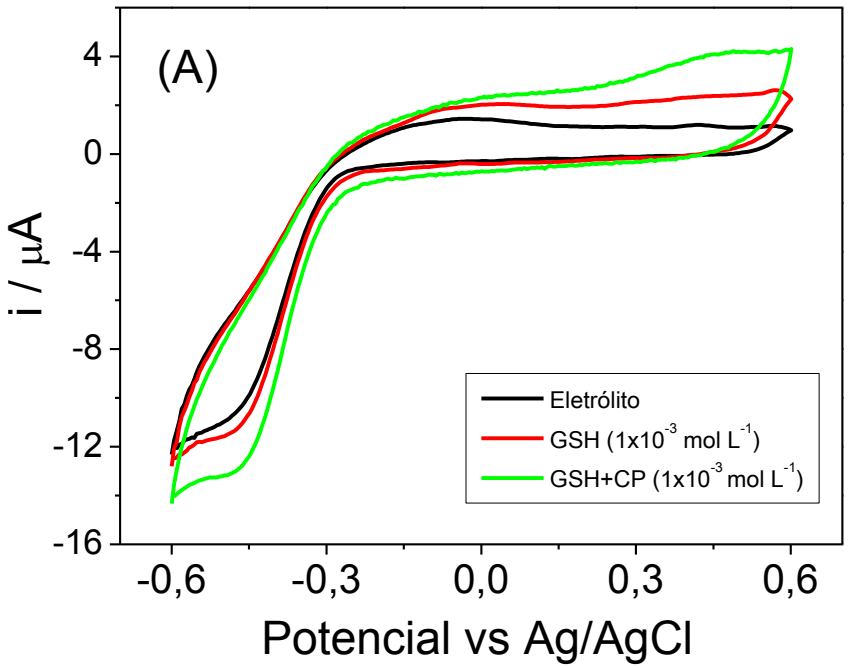


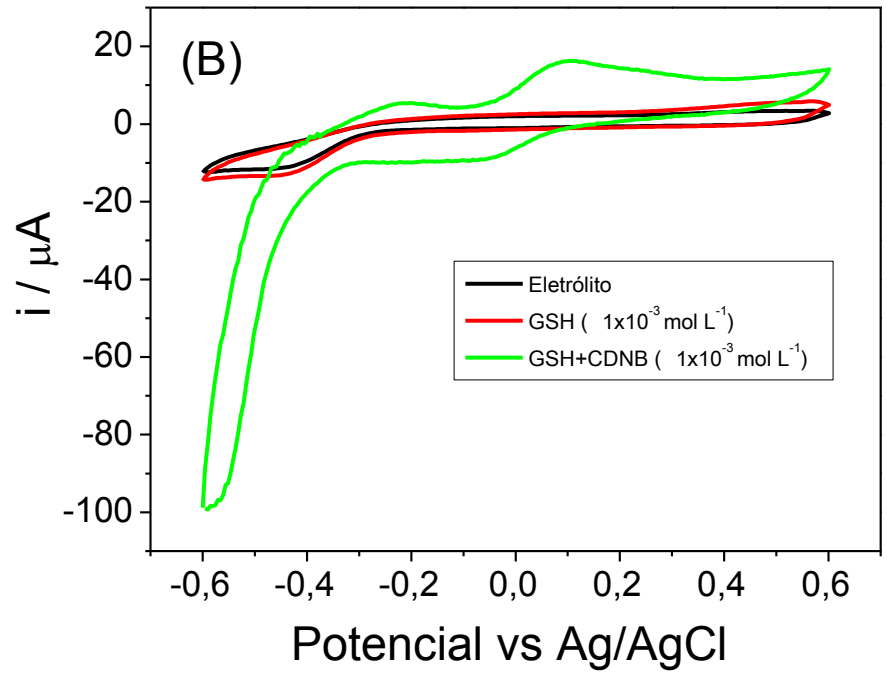
GSH + Cisplatina  GS-cisplatina (B) Reação (2)

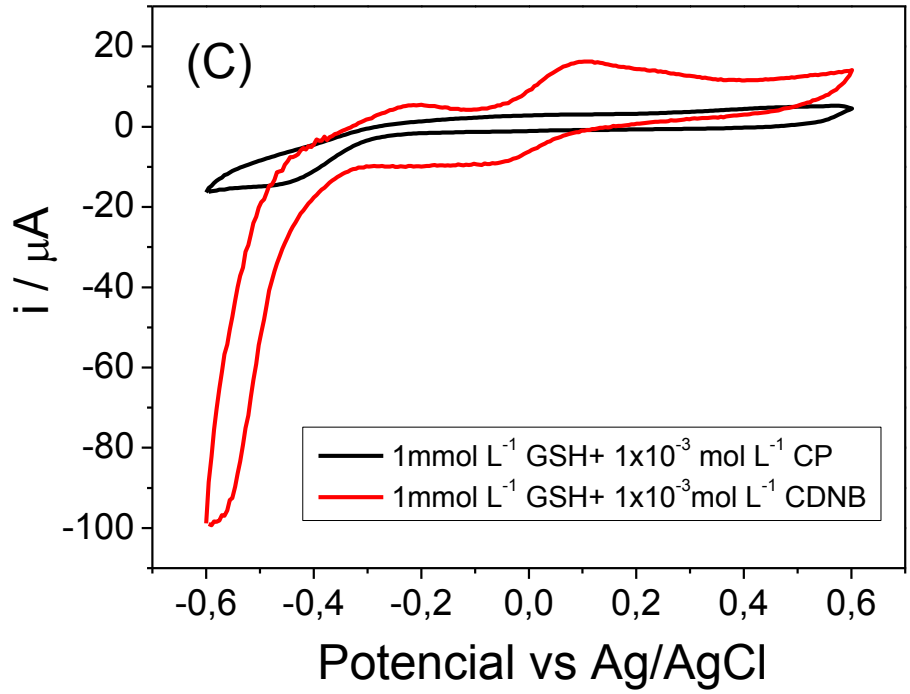


A reação de conjugação entre GSH e cisplatina foi monitorada em um gráfico típico de voltametria cíclica. Na Figura 13A pode ser visualizado que a corrente de pico anódica foi de 2,52 $x10^{-6}$ µA, enquanto na Figura 13 B o valor de corrente de pico anódica, que corresponde à reação entre GSH e CDNB, foi de 1,65x 10^{-5} µA. Os resultados obtidos corroboram com os ensaios enzimáticos da GST descritos na literatura (HABIG, 1974; ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2015), os quais indicam que a reação de CDNB tem maior constante de associação com a enzima quando comparado com a cisplatina.

Figura 13: Apresenta voltamogramas cíclicos das reações de conjugação em presença da enzima GST da (A) cisplatina + GSH (B) CDNB + GSH (C) comparação entre ambas às reações. A velocidade de varredura foi de 100 mVs^{-1} e a concentração usada de cada reagente foi $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.







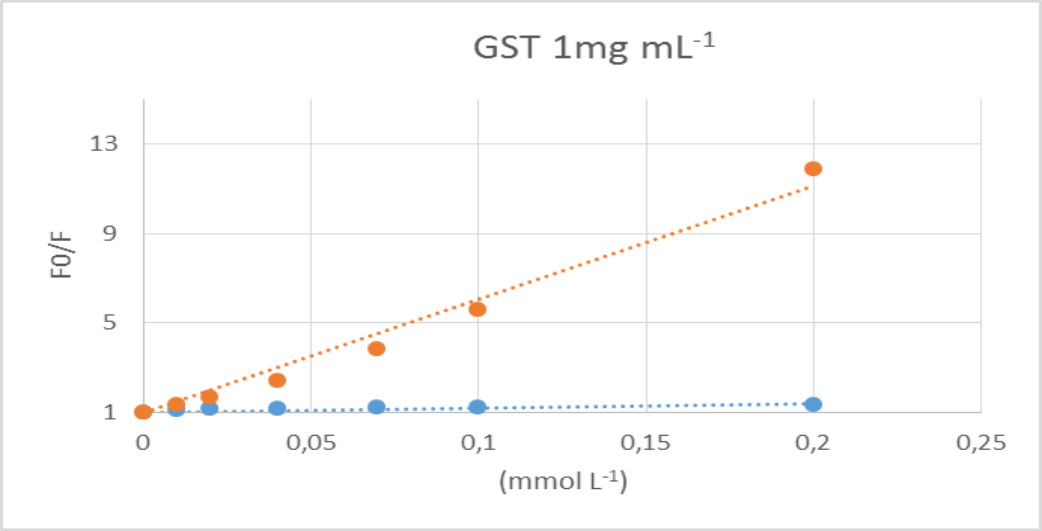
Com a finalidade de estimar as constantes de associação da enzima para a CDNB e cisplatina, foram realizados ensaios de fluorescência os quais são

apresentados no gráfico de Stern Volmer, onde se observa variação da fluorescência no sistema da enzima GST a diferentes adições de CDNB (linha laranja) e GST com diferentes adições do fármaco cisplatina (linha azul). Na literatura é bem conhecida a formação de complexos para ambos os sistemas (HAGRMAN; GOODISMAN; SOUID, 2003; KAMBLE; KULKARNI.; BHIWGAD, 2012), que é característico de um processo de " quenching estático" (formação de complexo). A partir do gráfico F_0/F *vs* concentração do substrato [Q] pode-se determinar a constante de Stern-volmer (K_{sv}), que corresponde a constante de associação (Ka) do complexo formado (COTRIM et al., 2010).

$$F_0/F = 1 + K_{sv}\,[Q] \qquad \text{(Equação 1)}$$

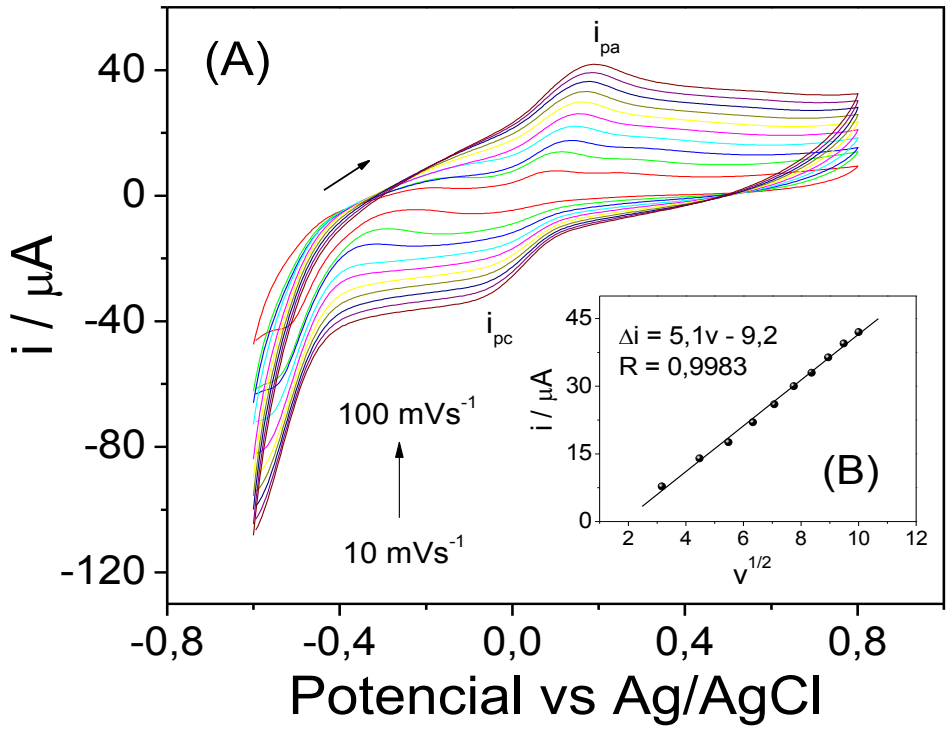
Figura 14 apresenta o gráfico de Stern Volmer onde se pode determinar as constante de associação (K_a) estimada para o CDNB foi de 50,79 $mmol^{-1}$ L e para o CP de 1,91 $mmol^{-1}$ L. É observado que a afinidade da enzima para com o CDNB é de cerca de 25 vezes maior que para a CP, corroborando uma vez mais, os resultados obtidos nos estudos eletroquímicos.

Figura 14: Gráfico de fluorescência da afinidade de GST com dois substratos CDNB (linha laranja) e cisplatina (linha azul).



A seguir foi realizado um estudo da velocidade de varredura com o biossensor proposto, o qual foi realizado entre 10 – 100 mV s^{-1} e foi verificada a presença de um pico anódico em 0,15 V e uma corrente catódica em -0,5 V (Figura 15). Conforme se aumentou a velocidade de varredura a corrente de pico anódico e catódico também aumentaram. O gráfico de corrente de pico (i_{pa}) *vs* raiz quadrada da velocidade de varredura (inserido) apresentou um perfil de resposta linear, demonstrando que o processo é controlado por difusão.

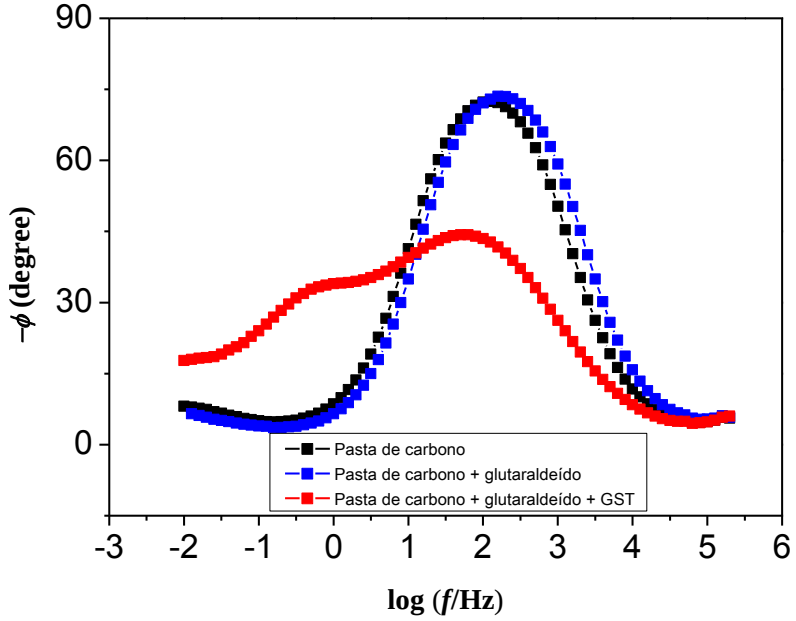
Figura 15: Estudo de velocidade de varredura com o biossensor proposto a partir da variação da corrente de pico anódica com a velocidade de varredura (10-100 mVs^{-1}) e gráfico de Δi_{pa} *vs* $v^{1/2}$ (B). Condições de análise: [GSH],[CDNB] = 1 mmol L^{-1} e [Cisplatina] = 1 mmol L^{-1} , Fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,5).



Adicionalmente, visando realizar o acompanhamento da imobilização da enzima no grafite, foram feitas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Assim, foram registrados espectros de impedância eletroquímica para a pasta de carbono sem modificar, para a pasta modificada com glutaraldeído e para o biossensor à base de pasta de carbono modificada com a enzima GST e glutaraldeído (Figura 16). Neste caso, foi usada a sonda de $[Fe\ (CN)_6]^{3-}$ e $[Fe\ (CN)_6]^{4-}$ em concentração de 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e as medidas realizadas em solução de eletrólito de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} a pH 6,5. As medidas de EIS foram realizadas através da aplicação de uma onda senoidal com amplitude de 10 mV (rms) em valor de potencial (potencial formal) de circuito aberto (EOC), e registrando 10 pontos/década, na faixa de frequências de 200 mHz a 10 kHz. Antes de obter o diagrama de impedância, todos os eletrodos foram submetidos ao mesmo programa de estabilização: 5 min em circuito aberto, seguido de 5 minutos aplicando o potencial em circuito aberto com a medida da corrente até que fosse alcançada a estabilização. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. A Figura 16 mostra o diagrama de Bode para os três eletrodos preparados. A presença de duas constantes de tempo para a pasta de carbono contendo enzima GST podem ser claramente observadas neste gráfico. A constante de tempo em região de altas frequências está relacionada com as modificações da pasta de carbono, e na região de baixa frequência está relacionada com a resistência de transferência de carga.

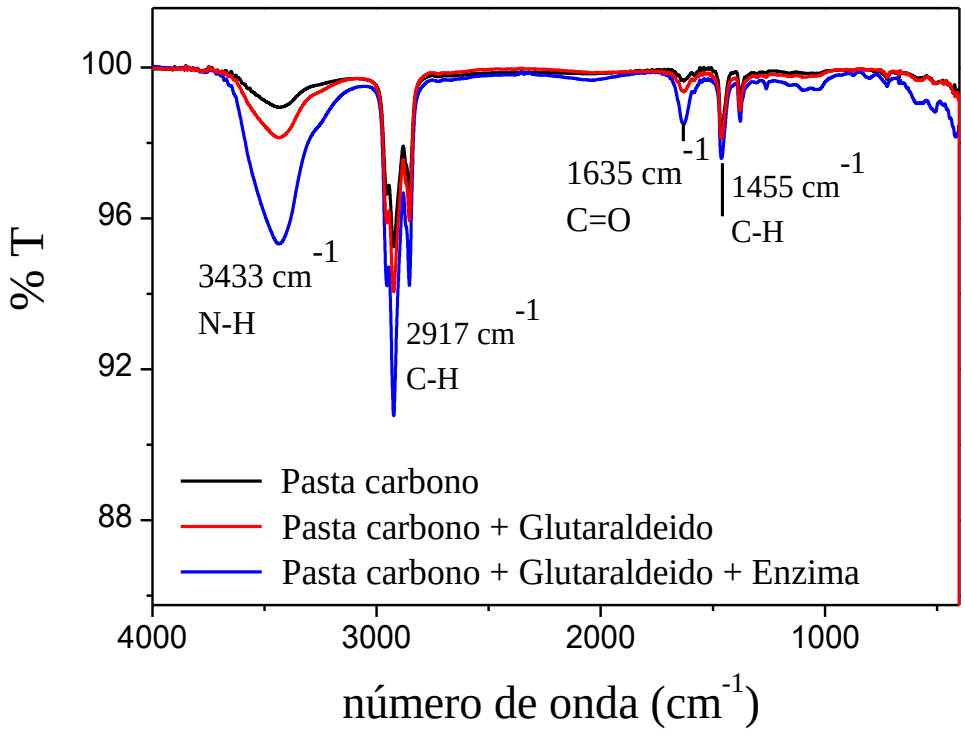
Figura 16: Gráfico de bode obtido das pastas de carbono sem modificar, pasta de carbono modificada com glutaraldeído e biossensor, medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} a pH 6,5. Na faixa de frequências de 200 mHz a 10 KHz. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$.



A Figura 17 mostra os resultados de análise na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para pasta de carbono não modificada, modificada com glutaraldeido e para o biossensor (pasta de carbono modificada com glutaraldeido e GST). Observa-se um aumento na intensidade da banda de 3433 cm^{-1} correspondente ao grupo NH_2 da enzima, as bandas de menor intensidade para a pasta de carbono e a pasta de carbono modificada com glutaraldeído, nessa mesma região correspondem aos grupos OH. As bandas em 1635 cm^{-1} que correspondente ao grupo funcional C=O e em 1455 cm^{-1} do grupo C-H também apresentam um aumento devido a presença da enzima na pasta.

Mostrando por estas duas técnicas de caracterização que a imobilização da enzima foi bem sucedida.

Figura 17: Espectros na região de infravermelho da pasta de carbono não modificada, pasta de carbono modificada com glutaraldeido e biossensor (pasta modificada com a enzima GST e glutaraldéido).

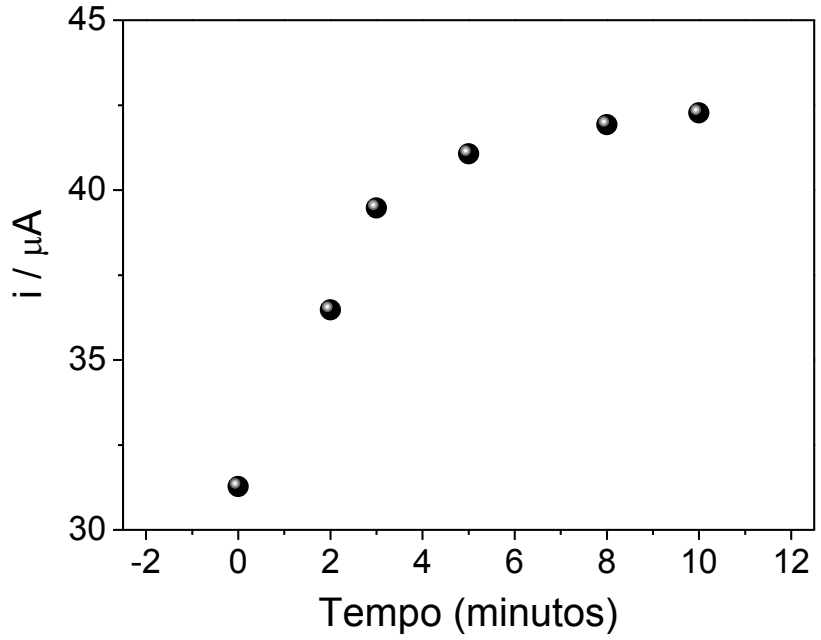


4.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE CISPLATINA NO BIOSSENSOR PROPOSTO POR TECNICAS VOLTAMÉTRICAS DE PULSO

Para otimização da quantificação realizou-se primeiramente o estudo de pH e tempo necessário para que ocorra a reação. Os valores de pH estudados foram os mesmos que no método espectrofotométrico (UV-VIS) (pH 4,5; 6,5 e 7,0). Encontrando-se como melhor pH na detecção eletroquímica o pH 6,5, o qual coincide com o valor reportado na literatura (KAMBLE; KULKARNI; BHIWGADE, 2012). No valor de pH 4,5 não foi possível obter sinal de quantificação porque possivelmente abaixo de 6,5 a enzima perde a atividade.

Em relação ao tempo necessário de reação do analito na superfície do eletrodo e em circuito aberto, nos experimentos de voltametria de redissolução adsortiva, 5 minutos foi escolhido por que permitiu obter sinais de correntes elevados em menor tempo, quando comparado aos valores obtidos para 8 e 10 minutos (Figura 18). Este resultado foi similar aquele encontrado nos experimentos por espectrofotometria UV-VIS (Figura 11 B).

Figura 18: Otimização do tempo de reação na resposta do biossensor por VOQ. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6,5), [Cisplatina] = 7x10^{-5} mol L^{-1}, Frequência de 10 Hz , Amplitude de 0,1 V e degrau de potencial de 5 mV.

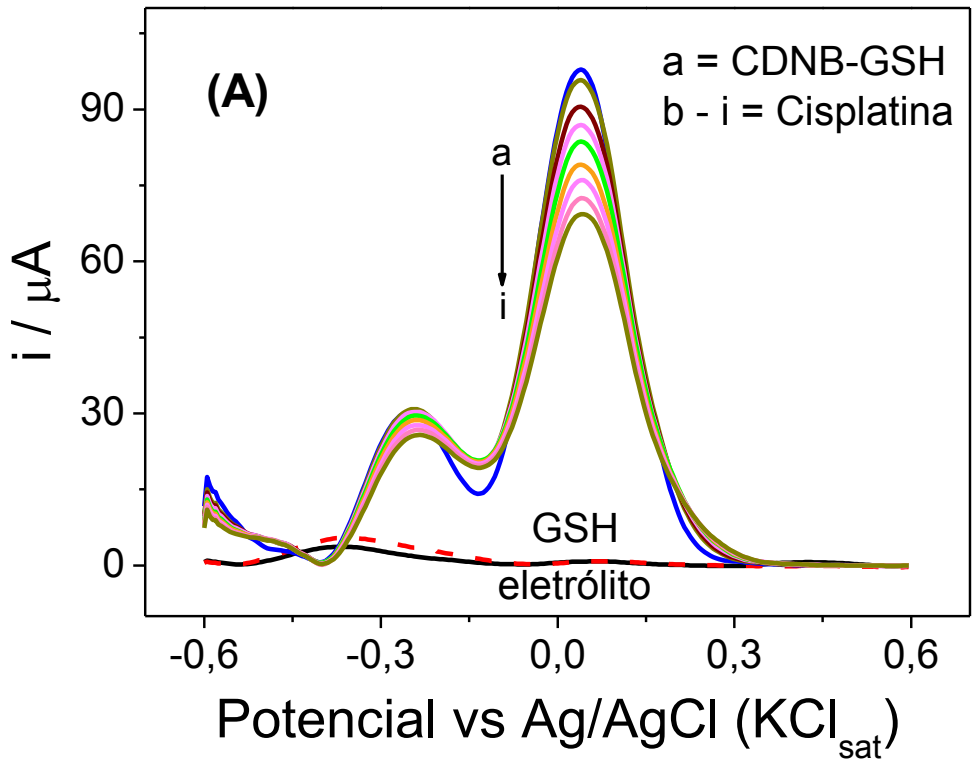


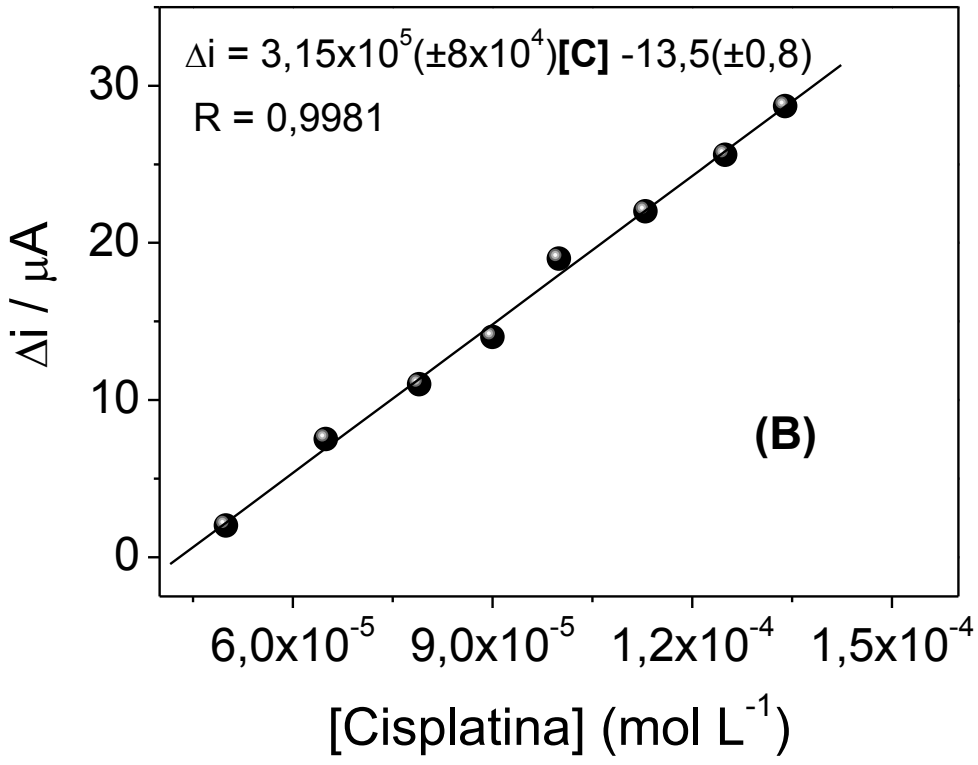
Uma vez otimizada a resposta do biossensor, as características analíticas do mesmo foram avaliadas sob as condições até aqui otimizadas na presença de cisplatina usando inicialmente VOQ (voltametria de onda quadrada).

Como mostrado na Figura 19A, a corrente diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de cisplatina. O biossensor mostrou uma resposta linear

entre 50 e 140 µmol L^{-1} de cisplatina. O limite de detecção foi de 8,8 µmol L^{-1} de cisplatina, com base na relação 3σ/s, onde σ é o desvio padrão do coeficiente linear da reta e s é o coeficente angular da reta (Figura 19B). Esta sensibilidade é comparável com outros métodos de detecção como HPLC e espectrometria de absorção atómica (BOSCH et al., 2008), mas não é tão sensível como o ICP-MS e HPLC-MS com fase reversa (MARTINCIC, 2012). Por outro lado, o biossensor de GST apresenta um baixo custo, resposta rápida e fácil manuseio em comparação com os métodos acima referidos.

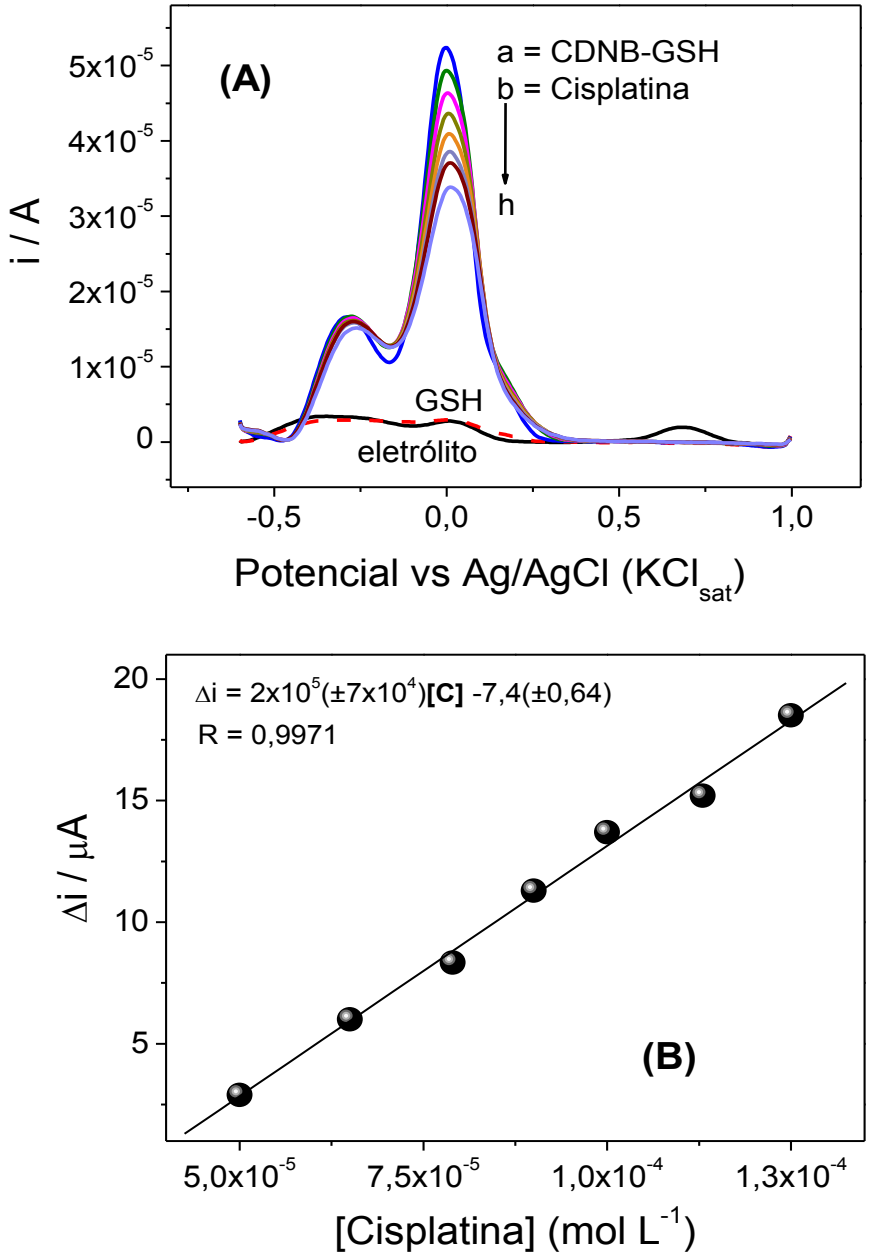
Figura 19:(A) Curva analítica obtida por VOQ em condições otimizadas: Solução tampão fosfato 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6,5) com concentrações crescentes de cisplatina. [GSH] = [CDNB] = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, [Cisplatina] em mol L^{-1}: a = 0; b= 5,0x10^{-5}; c= 6,5x10^{-5}; d= 7,9x10^{-5}; e= 9,0x10^{-5}; f= 1,0x10^{-4}; g=1,3x10^{-4}; h=2,5x10^{-4}; i=3,4x10^{-4}. (B) Quantificação da queda de corrente de pico em função da concentração de cisplatina. Frequencia 10 Hz , Amplitude 0,1 V , degrau de potencial 5 mV.





Adicionalmente à voltametria de onda quadrada (VOQ) foi também avaliada a voltametria de pulso diferencial (VPD) e os resultados obtidos são mostrados na Figura 20.

Figura 20: Quantificação por inibição através da diminuição da corrente de pico em função da concentração de cisplatina (A) e curva analítica (B) obtida pela VDP em 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} de solução tampão de fosfato (pH 6,5), [GSH] = [CDNB] = 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e com diferentes concentrações de cisplatina em mol L^{-1}: a = 0; b= 5,0x10^{-5}; c= 6,5x10^{-5}; d= 7,9x10^{-5}; e= 9,0x10^{-5}; f= 1,0x10^{-4} g=1,3x10^{-4}; h=2,5x10^{-4}. Amplitude 0,1 V, tempo de modulação 5 x 10^{-2} s, degrau de potencial 5 mV. Intervalo de tempo 0,2 s.



Os resultados comparativos das duas técnicas são mostrados na Tabela 1 que apresenta a resposta voltamétrica do biossensor em uma ampla faixa linear de concentrações para cisplatina. Quando comparado o perfil de resposta entre em VOQ e VPD, a VPD apresentou valores semelhantes.

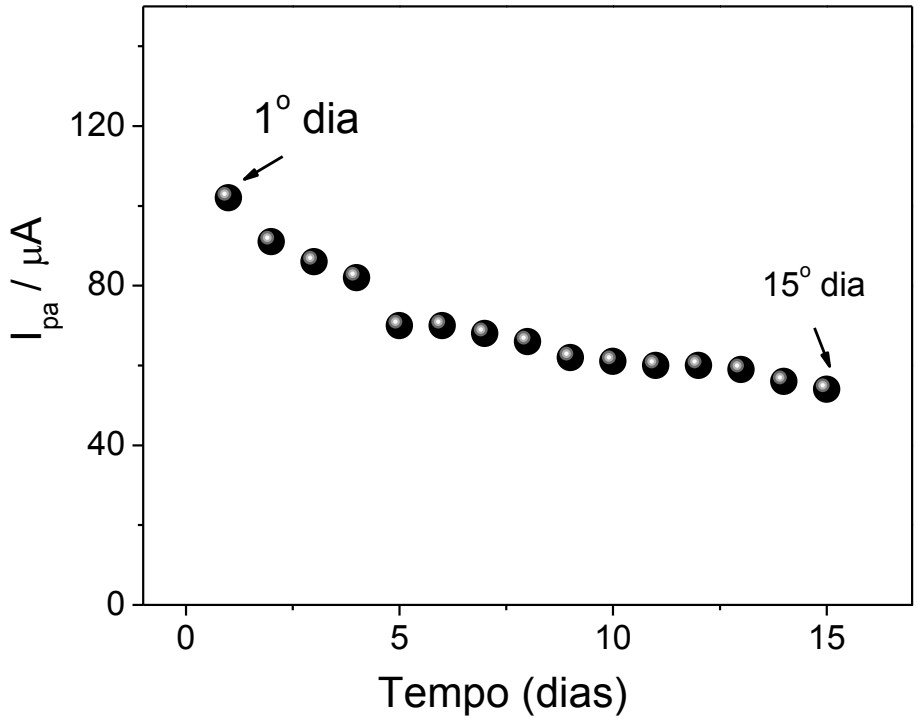
Tabela 1: Comparação entre voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial.

Técnica	Faixa linear (mol L^{-1})	Sensibilidade (μA $Lmol^{-1}$)	LOD (mol L^{-1})	LOQ (mol L^{-1})	Coeficiente correlação
VOQ	5,0x 10^{-5}-1,3x10^{-4}	3,1x10^{5}	8,8x10^{-6}	1,9x10^{-5}	R = 0,9981
VPD	5,0x10^{-5}-1,25x10^{-4}	2,0x10^{5}	6,5x10^{-6}	2,2x10^{-5}	R= 0,9971

4.1.4 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE ESTABILIDADE E SELETIVIDADE DO BIOSSENSOR

Para aplicação analítica é importante que o sensor seja estável e apresente respostas confiáveis durante longo período de tempo. Na Figura 21, é apresentado o perfil da estabilidade do biossensor durante 15 dias de uso, usando a VOQ e na presença de cisplatina.

Figura 21: Perfil da estabilidade do biossensor na presença de cisplatina. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6,5), [Cisplatina] = 7x10^{-5} mol L^{-1}, condições de VPD: Amplitude 0,1 V, tempo de modulação 5 x 10^{-2} s, degrau de potencial 5 mV. Intervalo de tempo 0,2 s.



Pode-se observar que a enzima GST imobilizada no grafite apresentou diminuição da atividade. Neste estudo, a resposta do biossensor na presença de cisplatina no primeiro dia de análise foi de 102 µA, que foi considerado o valor máximo. Nos dias seguintes, o eletrodo foi polido antes de cada medida, usando a mesma pasta. O valor decresceu progressivamente, atingindo uma corrente de 55 µA no décimo quinto dia de análise. Em comparação com o primeiro dia, foi observada uma perda de 47% do sinal de corrente. A perda de sinal poderia estar relacionada com a desnaturação ou lixiviação da enzima e também possível adsorção dos produtos da reação, bloqueando o acesso do substrato. Ressaltando que a repetibilidade intra-dia do sensor (no mesmo dia de análise) mostrou um valor em termos do desvio padrão relativo (RSD) de 4,2% (n = 4), demonstrando a boa repetibilidade da resposta eletroquímica do biossensor proposto durante uma jornada de trabalho. Portanto, o uso

da pasta de carbono, oferece a possibilidade de uma simples, rápida e eficiente renovação da camada de superfície do eletrodo, permitindo a utilização da mesma pasta de carbono modificada em várias medidas durante um longo período de tempo, mostrando que o biossensor desenvolvido é bastante promissor para análises em amostras reais.

A seguir, visando avaliar a resposta do biossensor para outros fármacos usados em quimioterapia, na Tabela 2, são apresentados os resultados referentes a vários fármacos antitumorais comumente usados em medidas eletroquímicas e espectrofotométricas.

Tabela 2: Resultados obtidos com o biossensor na análise dos fármacos antitumorais e metabolitos da sangue.

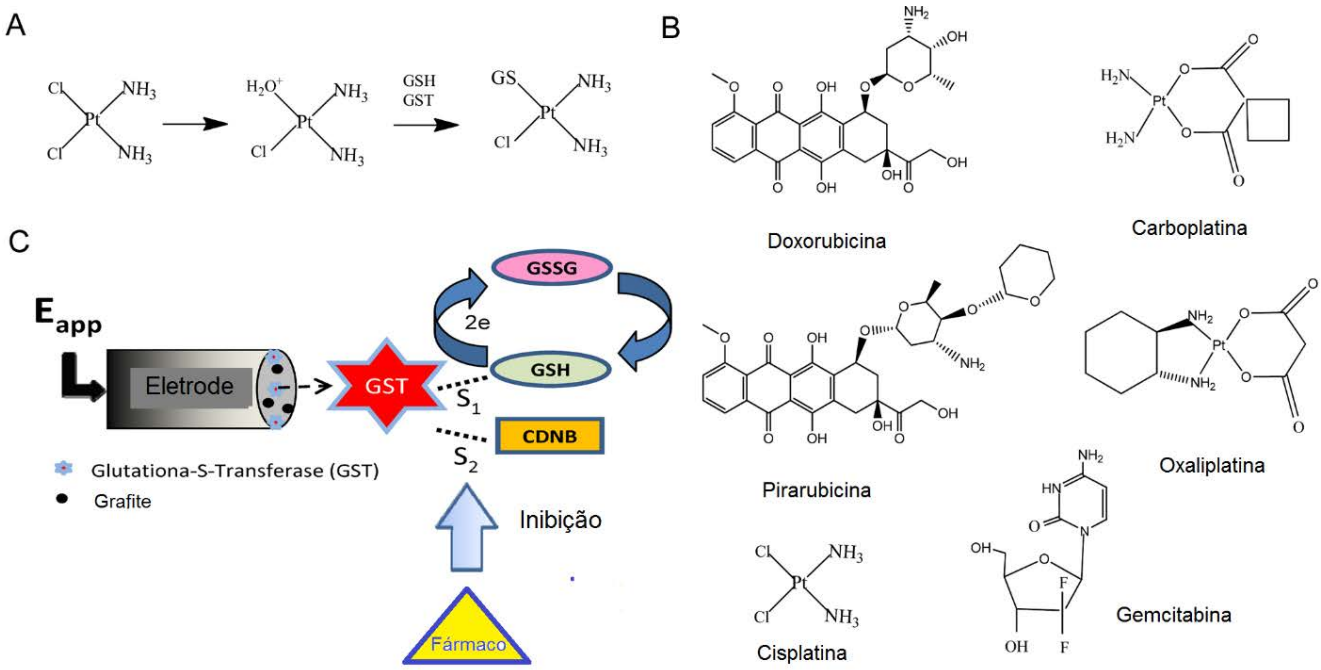
Fármacos	**Porcentagem de inibição / %**	
	Eletroquímica	**Espectrofométrica**
Cisplatina	6	47
Carboplatina	6	43
Gemcitabina	8	25
Oxaliplatina	13	57
Doxorubicina	17	-
Pirarubicina	21	45

Observa-se que os fármacos antitumorais cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, pirarubicina e gemcitabina, apresentaram taxas de inibição maiores quando analisado

por espectrofotometria (técnica de comparação). A diferença entre esses dois resultados deve-se à metodologia de análise. Enquanto no método espectrofotométrico os ensaios eram realizados com a enzima GST em solução, no método eletroquímico a GST encontrava-se imobilizada no eletrodo, tendo menor quantidade de enzima disponível para a reação catalítica, uma vez que apenas a superfície do biossensor é exposta à solução de análise. Assim, nos experimentos espectrofotométricos maior quantidade de GST encontra-se mais disponível, permitindo maior influência dos fármacos na catálise enzimática. Dentre todos os fármacos analisados podemos concluir que o pirarubicin e oxaliplatina apresentaram maior afinidade com a enzima GST, pois sofreram maior inibição. Podemos concluir então que este biossensor de GST não é seletivo para um determinado medicamento, mas sim para outros fármacos anticâncer também usados. Isto é esperado umas vez que, o sinal obtido por inibição da atividade enzimática possui esta característica, tal como o caso da acetilcolinesterase e peroxidase para pesticidas (MIROSLAV et al, 2012). Contudo, este resultado, não invalida o biossensor aqui mostrado, uma vez que a literatura carece de métodos de análises enzimáticos e eletroquímicos para este tipo de compostos. E desta forma, este trabalho mostrou a construção inédita de um biossensor para fármacos usados na terapia funcional à base da enzima GST.

Com base nos resultados obtidos, foi proposto um possível mecanismo de resposta para o biossensor na presença de cisplatina e dos outros fármacos quimioterápicos (Figura 22).

Figura 22: (A) Representação da reação de conjugação entre a GSH e a cisplatina em presença da enzima GST. (B) Estruturas dos fármacos usados na quimioterapia. (C) Mecanismo proposto para a resposta do biossensor.

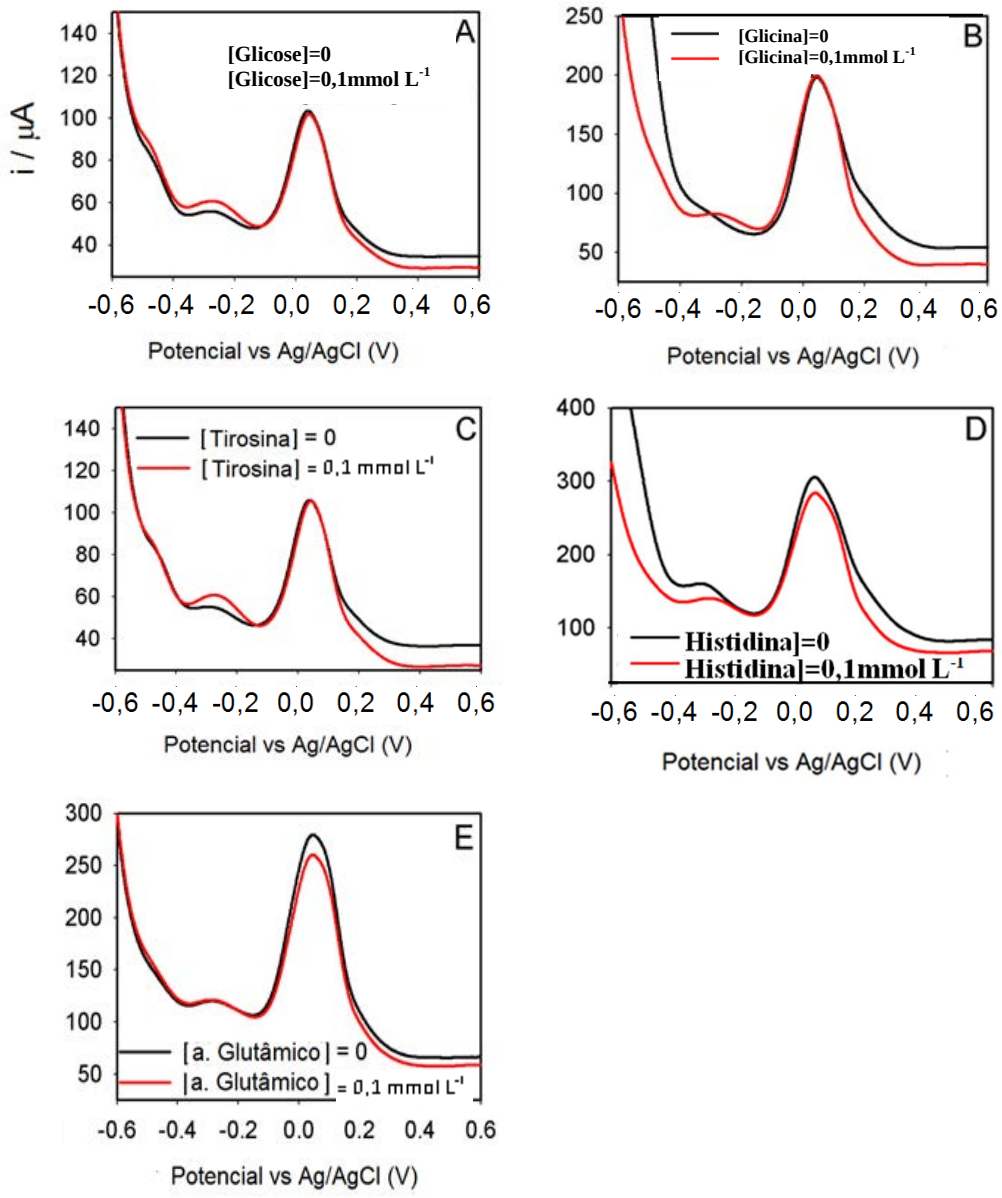


4.1.5 ESTUDO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR FRENTE À ALGUNS METABÓLITOS PRESENTES NO SANGUE

Para avaliar os possíveis interferentes na análise de sangue, foi avaliada a resposta do biossensor na presença de diversos aminoácidos, metabolitos e componentes comuns no sangue, usando a VOQ. Analisando a Figura 23 não se observou resposta para glicose, glicina ou tirosina, enquanto que a histidina e ácido glutâmico geraram uma pequena alteração de sinal, apresentando inibição do pico de corrente anódica no potencial de 0,1 V. Esta resposta pode ser relacionada com a reação electroquímica que ocorre entre GST e histidina ou ácido glutâmico. Pode-se dizer que a concentração total de metabólito ativo no interior de uma célula é

relativamente estável gerando um sinal constante, e que na presença dos fármacos quimioterápicos o sinal ainda deverá diminuir podendo então ser detectado, na presença destes “sinais de fundo”.

Figura 23: Resposta do biossensor para algúns possíveis compostos interferentes presentes no soro sanguineo. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6,5), condições de VPD: Amplitude 0,1 V, tempo de modulação 5 x 10^{-2} s, degrau de potencial 5 mV. Intervalo de tempo 0,2 s.

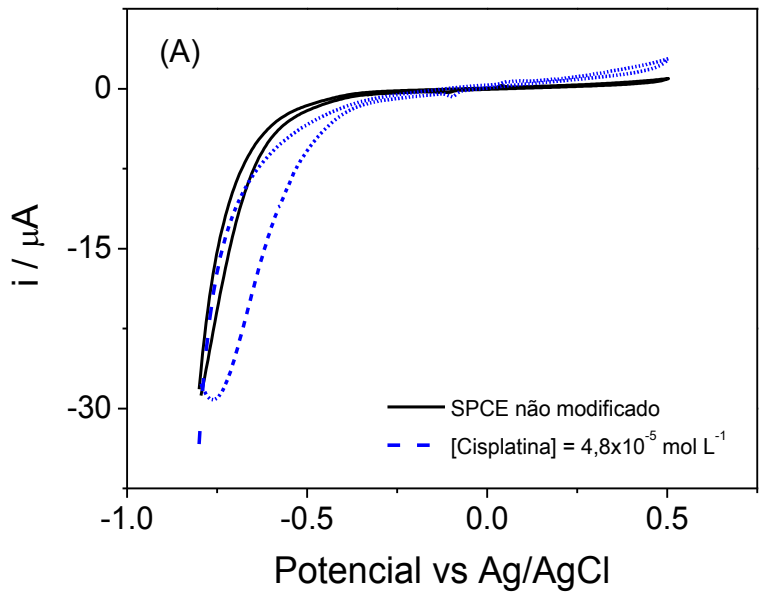


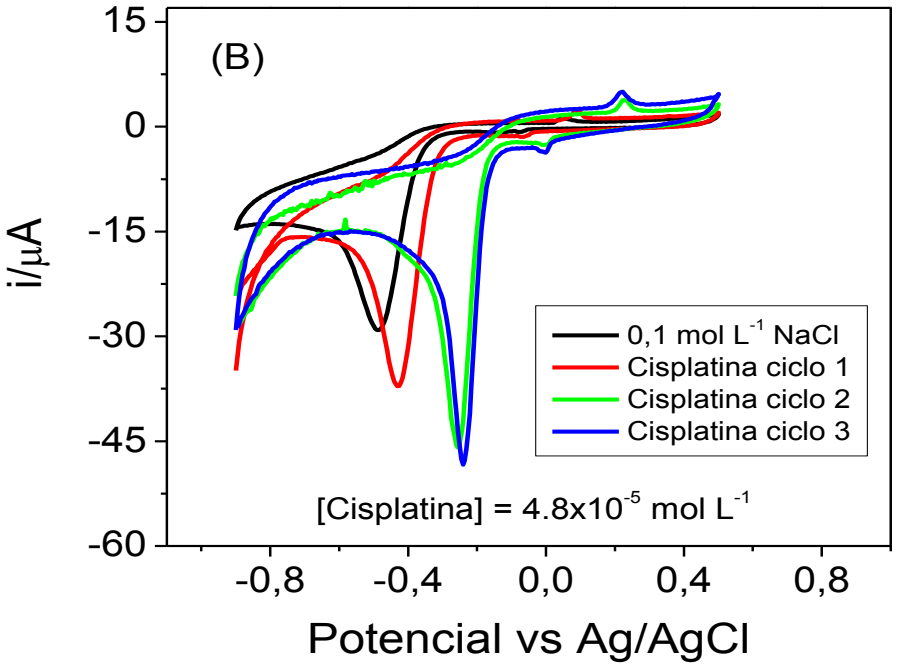
4.2 ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO MODIFICADO COM MWCNT NA DETECÇÃO DA CISPLATINA

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO SENSOR

A caracterização eletroquímica do sensor impresso na presença de cisplatina foi realizada utilizando voltametria cíclica, de modo a avaliar a influência dos MWCNT na resposta do sensor. A Figura 24A mostra a resposta eletroquímica do eletrodo de carbono impresso modificado com MWCNT (não modificado em 0,1 mol L^{-1} de solução de NaCl, na ausência (linha preta) e na presença (linha azul) de cisplatina. Em ambos os casos, não se observaram picos de oxidação. Já quando o SPCE modificado com MWCNT-COOH foi avaliado, este mostrou um grande aumento na corrente, sob as mesmas condições de análise. No entanto, observou-se que para varreduras consecutivas, o sistema cisplatina/NaCl era instável quando utlizado SPCE modificado com MWCNT-COOH, tal como mostrado na Figura 24B, na qual também pode ser visto claramente as variações na corrente de pico e potenciais de oxidação e redução da cisplatina.

Figura 24: Resposta eletroquímica por voltametria cíclica da cisplatina em sensor impresso em solução de eletrolito de NaCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), v= 50 mVs^{-1}: (A) eletrodo não modificado, (B) modificado com MWCNT-COOH.

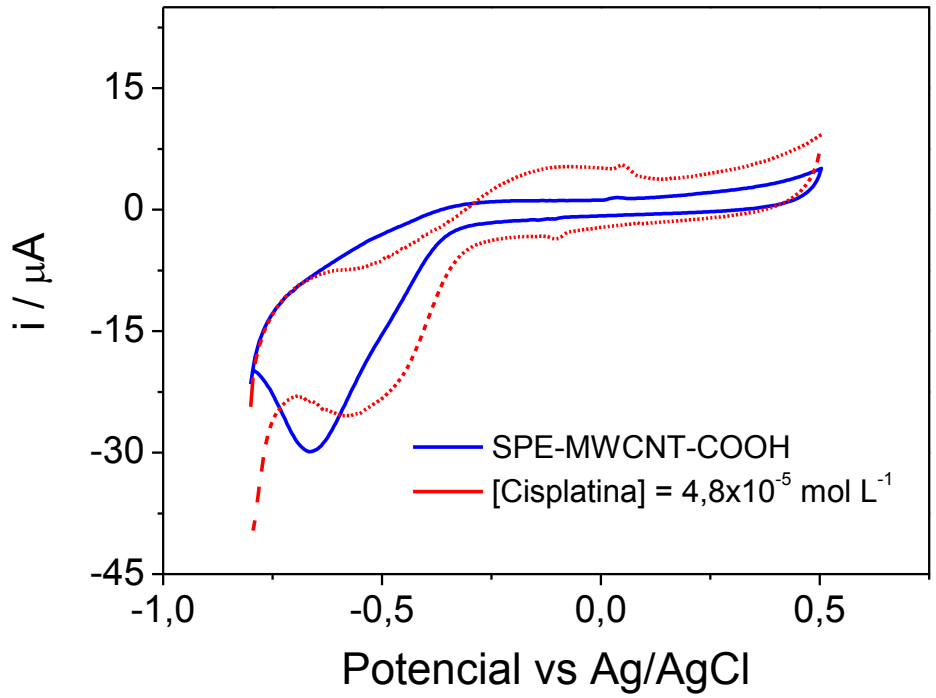




Diante disso, estudos preliminares usando o surfactante dodecilsulfato de sódio foram realizados como forma de contornar essas dificuldades. Na literatura têm sido relatado a adição de agentes tensoativos no eletrólito de suporte com o objetivo de alterar as propriedades da interface eletrodo/solução, visando facilitar a transferência de elétrons e aumentando o sinal de corrente (DIGUA; KAUFFMANN; DELPLANCKE, 1994; DIGUA; KAUFFMANN; KHODARI, 1994; NIRANJANA et al, 2009; LI et al, 2011). Assim, visando avaliar o efeito do surfactante na detecção de cisplatina, neste trabalho, propôs-se estudar os efeitos da adição de SDS (agente tensoativo aniônico) no eletrólito suporte, utilizando eletrodos impressos modificados com MWCNT-COOH. Assim, como observado na Figura 25A foi verificado um aumento na corrente de fundo com o novo sistema contendo 0,1 mol L^{-1} de NaCl e 8,0x10^{-4} mol L^{-1} de SDS (NaCl/SDS). Com este sistema, a corrente de pico de corrente anódica (I_{pa}) foi observada em potencial de -0,25 V para a espécie de interesse. O SDS por apresentar grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, possibilitou alterar as propriedades da interface eletrodo/solução; permitindo a interação com o analito favorecendo seu deslocamento até a superfície do eletrodo (NIRANJANA *et al*, 2009). É importante ressaltar que o uso de surfactante, neste caso é relevante, porque na ausência deste não foi possível

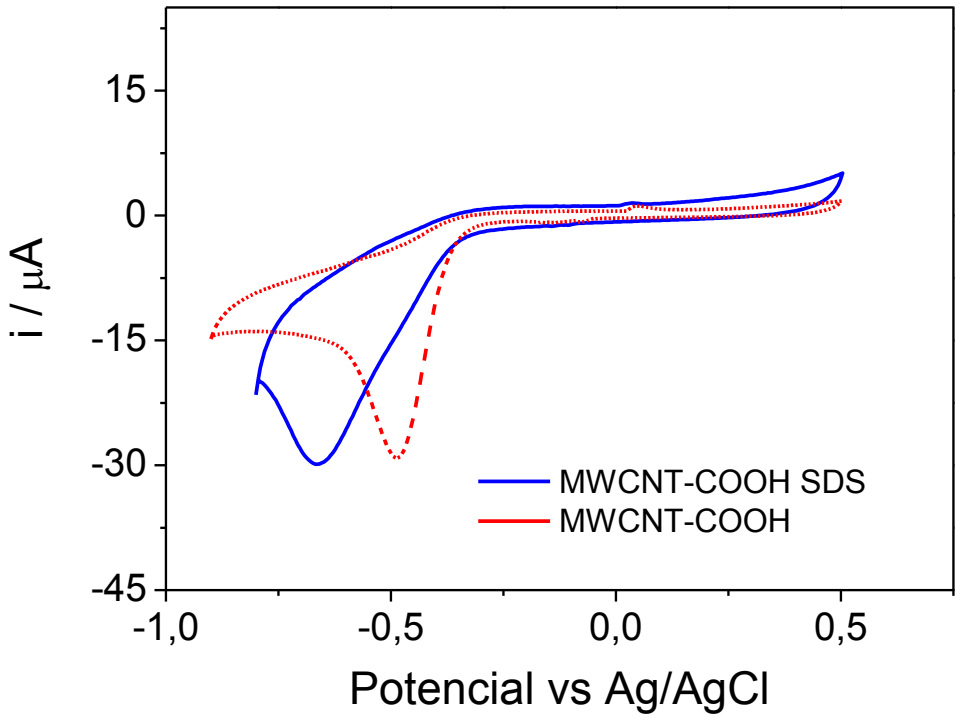
quantificar a cisplatina. A presença do surfactante promoveu uma maior estabilidade do sinal de corrente na voltametria cíclica com formação de micelas cisplatina facilitando a sua determinação.

Figura 25: Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com MWCNT de uma solução contendo 0,1 mol L^{-1} de NaCl (pH 7,0) e 8,0x10^{-4} mol L^{-1} de SDS (NaCl/SDS) em ausência e presença de cisplatina. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} e faixa de potencial entre -1,0-0,6 V.



Estudos voltamétricos com o eletrodo de carbono impresso modificado com MWCNT na ausência e presença de SDS foi realizado conforme Figura 26. Pode ser visto claramente que em potencial de -0,35 a 0,15 V não há atividade redox e variação de corrente, o que era esperado.

Figura 26: Voltamograma cíclico do eletrodo impresso na presença e ausência de SDS usando NaCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) como eletrólito de suporte. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1}.

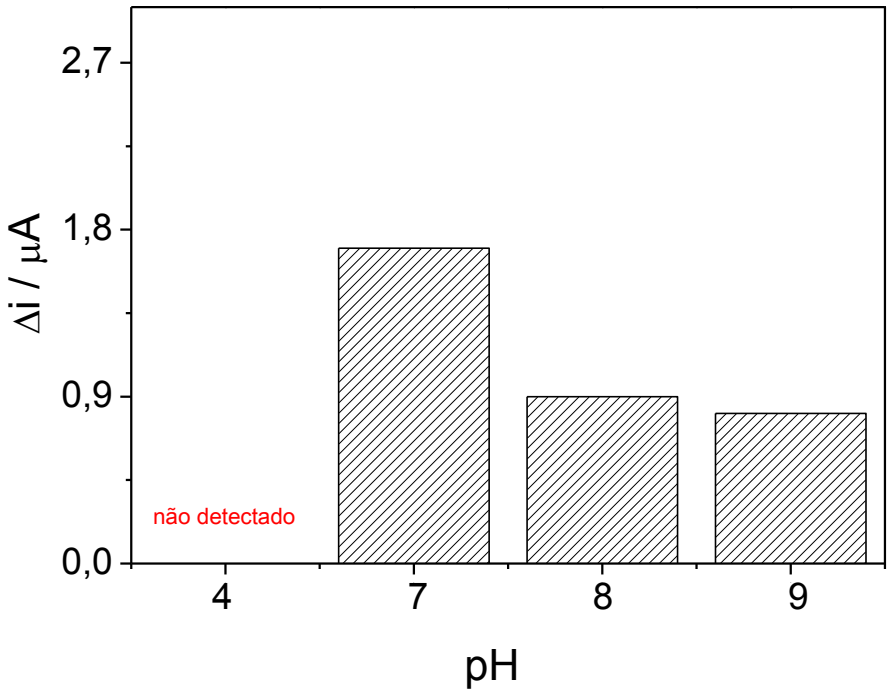


4.2.2. INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO SUPORTE E pH NO SENSOR MWCNT-COOH/SDS/SPE

Primeiramente, foi avaliada a influência do eletrólito suporte na resposta eletroquímica no sensor *MWCNT-COOH/SDS/SPE.* Os eletrólitos estudados foram tampão acetato, tampão fosfato, solução fosfato salina (PBS), tampão tris-HCl e NaCl, todos em concentração igual a 0,1 mol L^{-1} em pH 5,0 e 7,0. Os picos voltamétricos foram obtidos em todos estes eletrólitos, mas a melhor resposta encontrada foi para 0,1 mol L^{-1} de solução de NaCl empregando a técnica de voltametria de redissolução anódica. O efeito do pH foi também avaliado em pH 4,7,8 e 9 de solução de NaCl. O

pH escolhido foi pH 7,0 empregando a mesma técnica de avaliação. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 27.

Figura 27: Estudo do efeito do pH na resposta do sensor. Medidas realizadas em VPD usando 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0,8 V e t_{acc} = 50 s e [Cisplatina] = 2,0x10^{-3} mol L^{-1}.

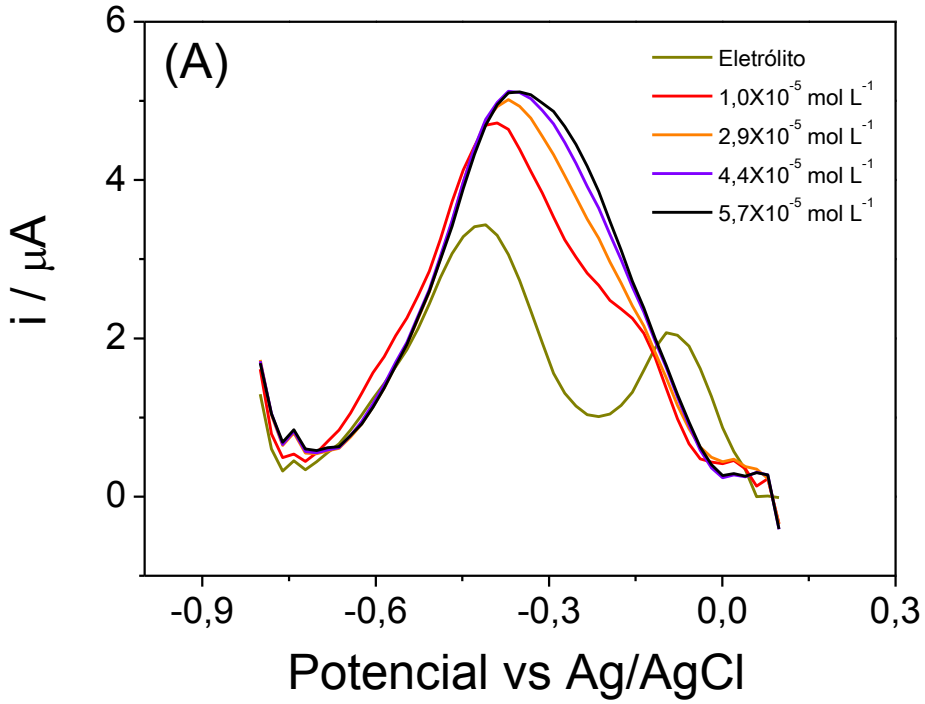


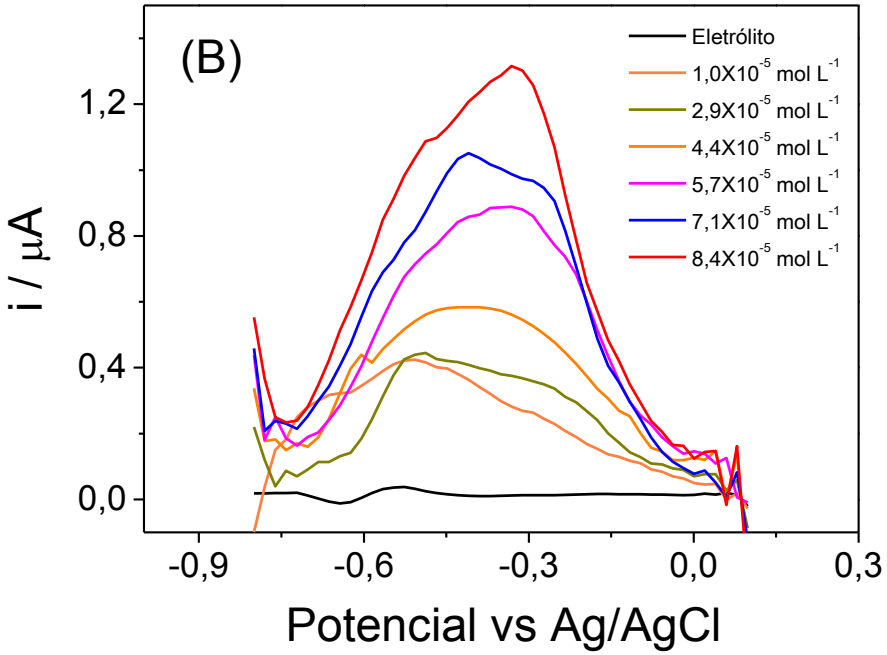
4.2.3. OTIMIZAÇÃO DO SURFACTANTE UTILIZADO

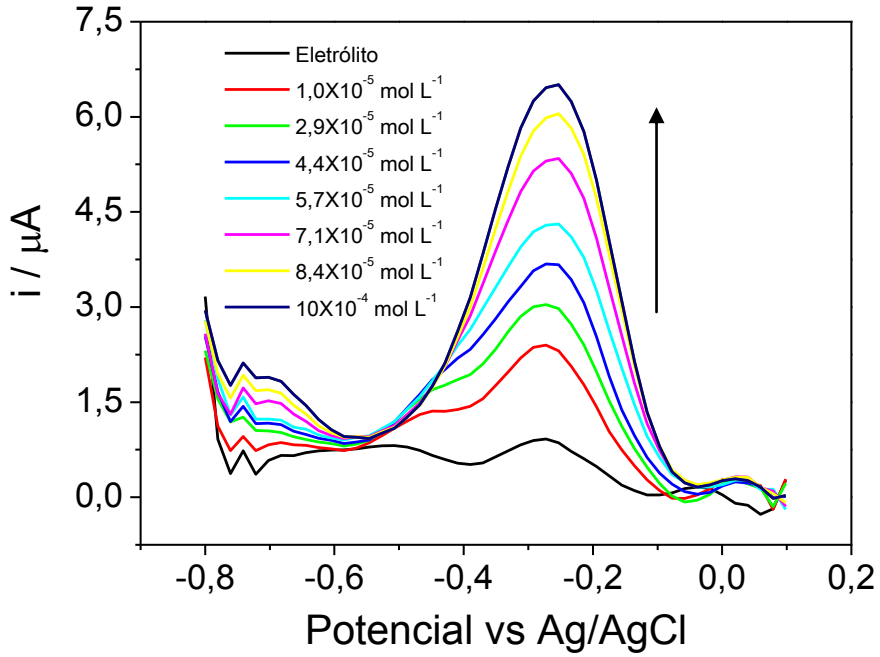
Foi avaliada a interação do fármaco cisplatina com surfactantes aniônicos, catiônicos (CTAB, brometo de cetiltrimetilamônio) e não-iônicos (Triton X-100). Encontrando-se melhor resposta e quantificação só com o surfactante aniônico SDS, que além de resolver os problemas de adsorção do analito, acabou promovendo uma maior repetibilidade na medidas eletroquímicas. Os resultados deste estudo são

mostrados na Figura 28. Desta forma, o SDS (Figura 28 C) foi escolhido para os experimentos subsequentes.

Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial para a resposta à cisplatina do sensor proposto usando surfactante (A) CTAB, (B) Triton X e (c) SDS. Medidas realizadas 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), condições VPD: Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0,8 V e t_{acc} = 50 s e [Cisplatina] = 2,0x10^{-3} mol L^{-1}.





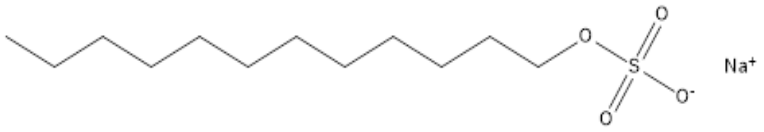


A seguir foi otimizada a quantidade de SDS na solução de análise e verificou-se que grandes quantidades do surfactante promove a diminuição da corrente de pico nas voltametrias de pulso diferencial (a qual foi previamente otimizada; tempo de

modulação 50 ms, amplitude de 75 mV, degrau de potencial de 8 mV, intervalo de tempo de 0,5 s).

O valor encontrado como ótimo para o surfactante, SDS, no eletrólito suporte foi de 8,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

Figura 29: Estrutura do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS).



dodecil sulfato de sodio

A seguir foram otimizados outros parâmetros que influenciam na resposta do sensor, e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros avaliados para melhor desempenho do sensor

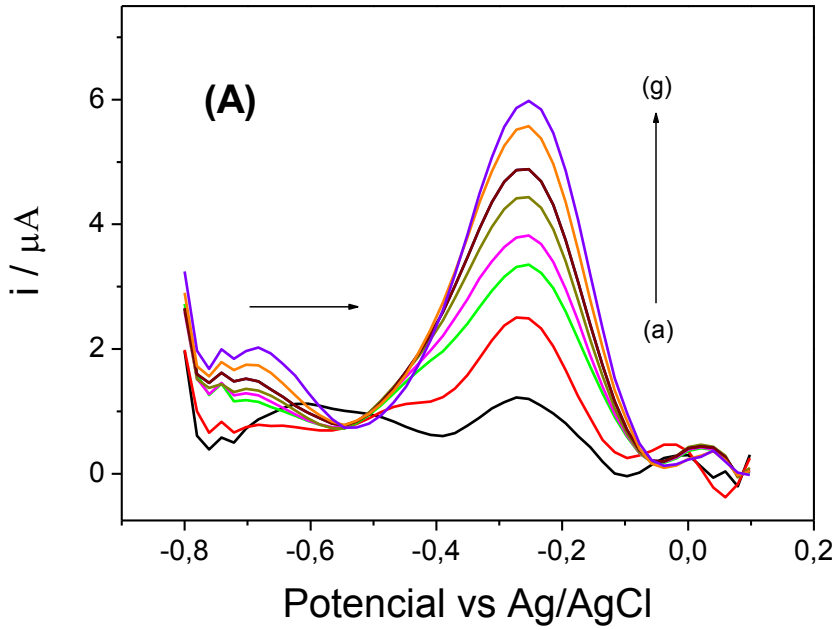
Parâmetros avaliados						
[NaCl] / mol L^{-1}	0,01	0,025	0,05	0,075	**0,1[a]**	--
[SDS] / mol L^{-1}	$8,0\times10^{-5}$	$1,6\times10^{-4}$	$4,0\times10^{-4}$	**$8,0\times10^{-4}$ [a]**	1×10^{-3}	--
pH (0,1 mol L^{-1} NaCl)	6,0	6,5	**7,0[a]**	7,5	8,0	8,5

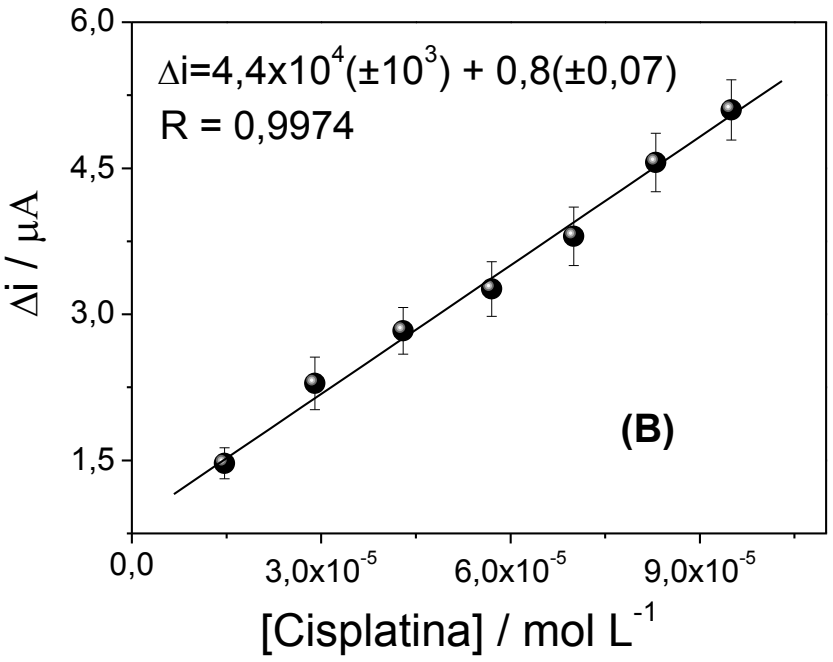
[a] *parametros otimizados*

4.2.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO À BASE DE MWCNT-COOH/SDS/SPE

Sabendo que as melhores resposta do sensor para cisplatina foram obtidas com o eletrolito NaCl 0,1 mol L^{-1} a pH 7,0, este apresentou o perfil de resposta mostrado na Figura 30A. A curva analítica obtida nestas condições de análise (Figura 30B) mostrou uma faixa de resposta entre 1,45 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} com um ajuste linear de R = 0,9974, uma sensibilidade de 4,5x10^{4} (±1,0x10^{3}) µA mol L^{-1}, com limites de detecção e quantificação de 4,6x10^{-6} e 1,4x10^{-5} mol L^{-1}, respectivamente. A reprodutibilidade na resposta do sensor foi avaliada através da análise de três replicatas, sendo encontrado o valor de RSD de 3,9%. Estes experimentos demonstram que o sensor à base de MWCNT-COOH/SDS/SPE tem boa estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade para a determinação da cisplatina.

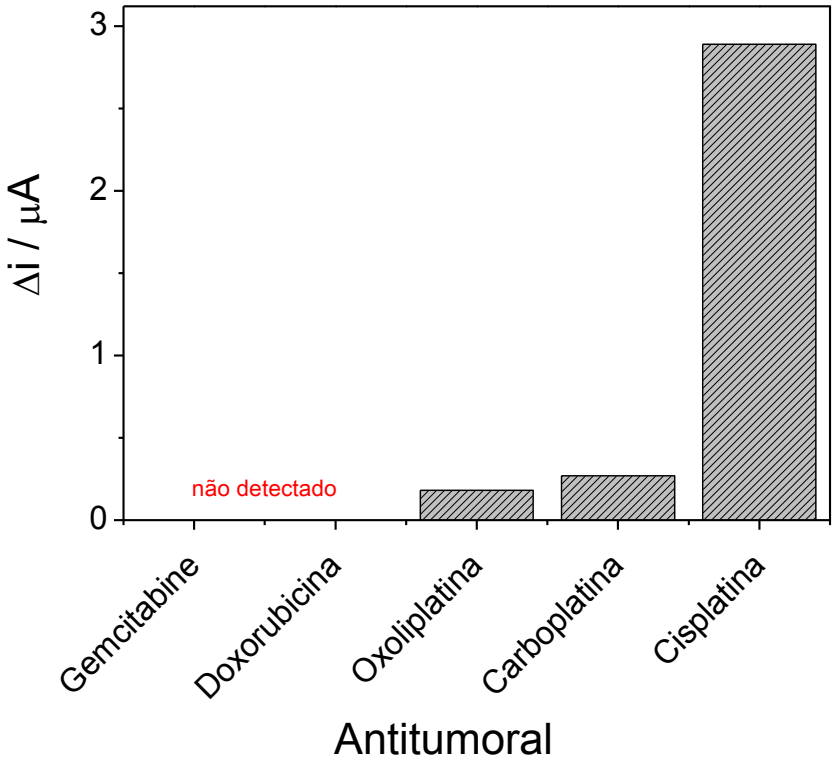
Figura 30: (A) Perfil de resposta do sensor para cisplatina usando DPV; (B) Curva análitica correspondente. Medidas realizadas em VPD usando 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0,8 V e t_{acc} = 50 s e [Cisplatina] = 2,0x10^{-3} mol L^{-1}.





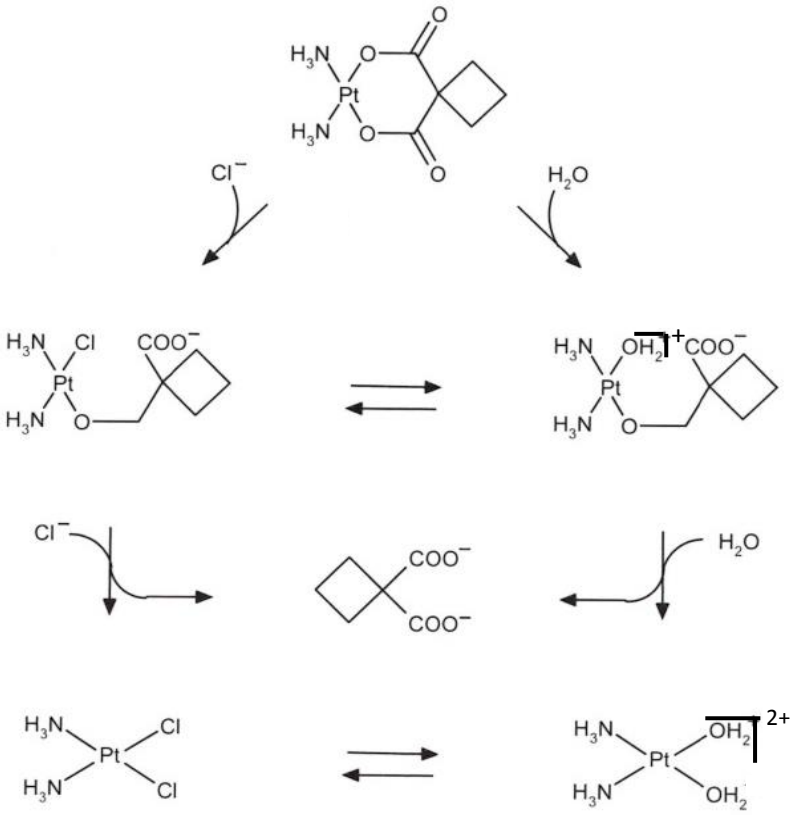
A seletividade do sensor foi avaliada a partir da análise de outros fármacos que formam complexos metalo-orgânicos de platina, como carboplatina e oxaliplatina e componentes organicos como doxorrubicina e gemcitabina, todos estes empregados na terapia antitumoral. É interesante ressaltar que para os compostos puramente orgânicos o sensor não apresentou resposta eletroquímica significativa na faixa de potencial avaliada para a cisplatina. Por outro lado, os complexos oxaliplatina e carboplatina apresentaram uma resposta muito baixa quando comparada com a cisplatina, a qual apresenta um melhor perfil do pico anodico na voltametria de redissolução (Figura 31).

Figura 31: Rsposta em VPD obtida para diferentes compostos antitumorais. Medidas realizadas em 0,1 mol L^{-1} NaCl (pH 7,0), Tempo de modulação= 0,5 s, A = 75 mV, ΔE = 8 mV, E_{acc} = -0,8 V e t_{acc} = 50 s em NaCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) [Cisplatina] e outros fármacos = 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1}.



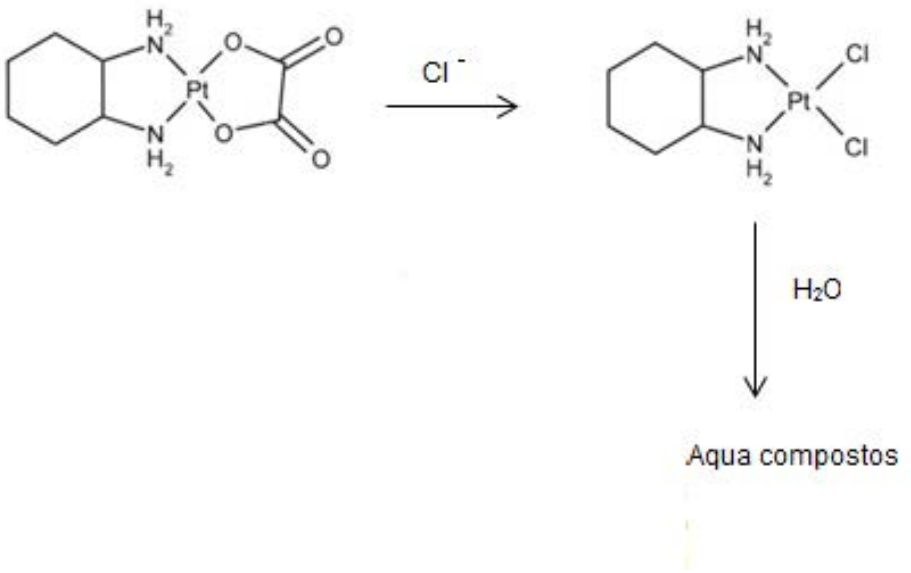
Já a carboplatina e a oxaliplatina apresentaram respostas apenas na primeira adição. Cabe ressaltar que, de todos os fármacos analisados, a cisplatina tem uma maior possibilidade para a formação de micelas com o SDS, devido à presença dos dois ligantes Cl^- facilmente ionizáveis, diferentemente das oxaliplatina e carboplatina (Figuras 32 e 33), permitindo uma melhor interação das espécies ionizadas com o surfactante, facilitando respostas eletroquímicas mais estáveis e reprodutíveis.

Figura 32: Mecanismo de hidrólise da carboplatina em solução de NaCl



A carboplatina é um fármaco que exibe atividade equivalente à cisplatina, com a vantagem de ser menos nefrotóxica. Conforme a Figura 32, a carboplatina reage com Cl^- e com H_2O, formando como produto final cisplatina e espécies diaquo-cisplatina; as espécies mono- e diaquo- são as responsáveis por ligar a platina ao DNA. Na concentração de 0,1mol L^{-1} de solução de NaCl (pH 7) em temperatura de 37 ^oC, o tempo de meia vida da carboplatina é de 245 horas, caracterizando assim uma reação muito lenta (TESTA B, MAYER M. J., 2003).

Figura 33: Mecanismo de hidrólise da oxoplatina em solução de NaCl



Da mesma forma, o composto oxaliplatina (Figura 33), que apresenta um quelante diamina, na presença de cloreto no plasma sanguineo à temperatura corporal de 37 ^{o}C troca seus ligantes carboxilatos por ligantes cloreto para formar o produto dicloro(*trans*-diaminociclohexano)platina(II). O tempo necessário para a conversão de 30% de oxoplatina em dicloro(*trans*-diaminociclohexano)platino(II) é de 1 hora (TESTA B, MAYER M. J., 2003). O dicloro(*trans*-diaminociclohexano)platina(II) reage mais preferencialmente com as células tumorais do que a oxalilplatina, o tempo de vida-meia desta reação equivale a 1,7 h. Através dos mecanismos descritos anteriormente, observa-se que a estrutura química mais simples é de fato a cisplatina. Essa simplicidade estrutural parece permitir à cisplatina maior capacidade de formar espécies reativas mono- ou diaqua- espécies do que os outros compostos de platina estudados, o que, aparentemente, favorece a formação de micelas com o SDS.

4.2.5 MECANISMO PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DA CISPLATINA

Algumas das novas realizações no desenvolvimento de nanopartículas à base de lipídeos que apresentam a liberação controlada de cisplatina pode conter a base para a compreensão do papel crucial da função do SDS utilizado no eletrodo impresso modificado com MWCNT na detecção deste fármaco. As estratégias básicas para a construção das nanopartículas se baseia no equilíbrio de cisplatina e do seu cátion mono-aquo em meio aquoso.

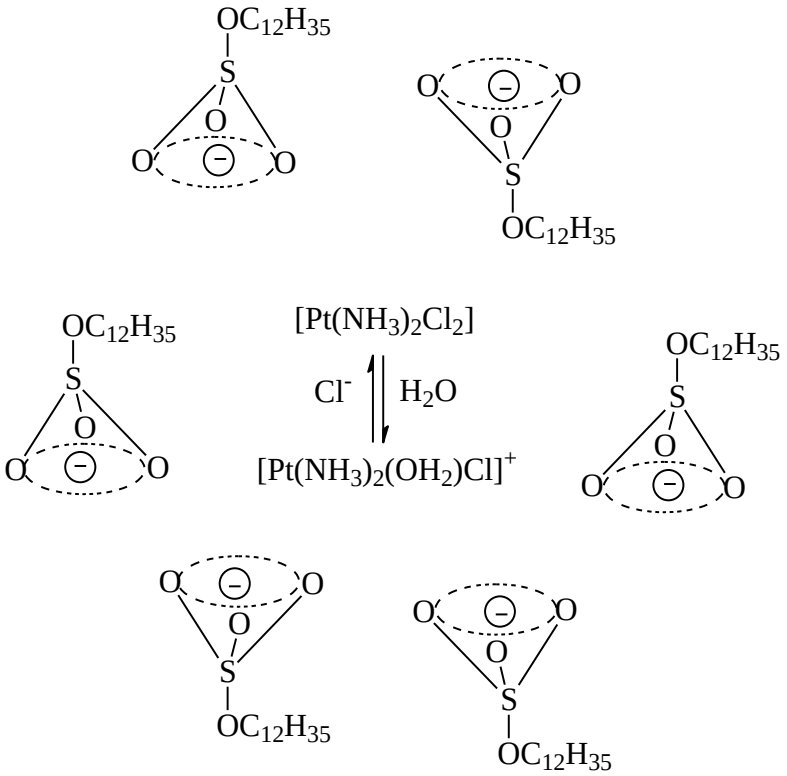
$$[Pt(NH_3)_2(Cl)_2] + H_2O \rightleftharpoons [Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+ + Cl^- \quad \text{(Reação 3)}$$

O cátion mono-aquo pode sofrer hidrólise, como resultado da ausência de íons cloreto, sendo as soluções de cisplatina instáveis (BARNES-PRICE et al, 2000) (YOTSUUANAGI, 2002). No entanto, a presença de espécies catiónicas é desejável no processo de congelamento e descongelamento repetitivos de formação de nanopartículas, funcionando através de um mecanismo em que a cisplatina (menos solúvel) precipita eventualmente revestida como produto da hidrólise com carga positiva. A presença neste meio de lipídeos carregados negativamente acabam organizando esses arranjos nas nanopartículas, que não se dissolvem. Durante este processo, é importante evitar a presença de anions cloreto, que inibem a formação de espécies carregadas, e de detergentes, tais como SDS, que estabilizam as espécies carregadas por atração electrostática ou a formação de micelas, impedindo assim a formação da cisplatina carregada e os produtos de hidrólise do núcleo da nanopartícula (BURGER et al, 2002; HAMELERS; de KROON, 2007; KHIATI et al, 2011; GUO et al, 2013). EI-KHATEEB e colaboradoresv (EI-KHATEEB et al, 1999) e Bell e colaboradores (BELL et al, 2006), empregaram SDS como um componente da fase móvel na separação e quantificação de cisplatina por HPLC. SDS foi usado para estabilizar o tempo de retenção da cisplatina monohidratada. A presença de SDS, em pequenas quantidades foi importante para a separação em eletroforese capilar da cisplatina e seus derivados a partir de várias matrizes (NGUYEN et al, 2013). Mesmo

que não ocorra interação do SDS com nenhum desses complexos de platina (El-KHATEEB et al, 1999) este surfactante estabiliza às espécies carregadas por atração eletrostática ou pela formação de micelas, impedindo assim a formação de produtos de hidrólise da cisplatina (BURGER et al, 2002; HAMELERS et al, 2007; KHIATI et al, 2011; GUO S. et al, 2013).

No presente trabalho, a cisplatina foi dissolvida em solução salina, o que assegurou que o composto permanecesse preferencialmente como as espécies não-hidrolisadas. No entanto, o SDS adicionado pode mudar, em nível molecular, o equilíbrio no sentido da forma aquo-carregada (reação 3) $[Pt\ (NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ (BURGER et al, 2002; HAMELERS et al, 2007; KHIATI et al, 2011; GUO et al, 2013) que agora, em nível molecular, permitirá formar agregados, os quais tem um longo tempo de vida pela estabilização com o SDS (Figura 34).

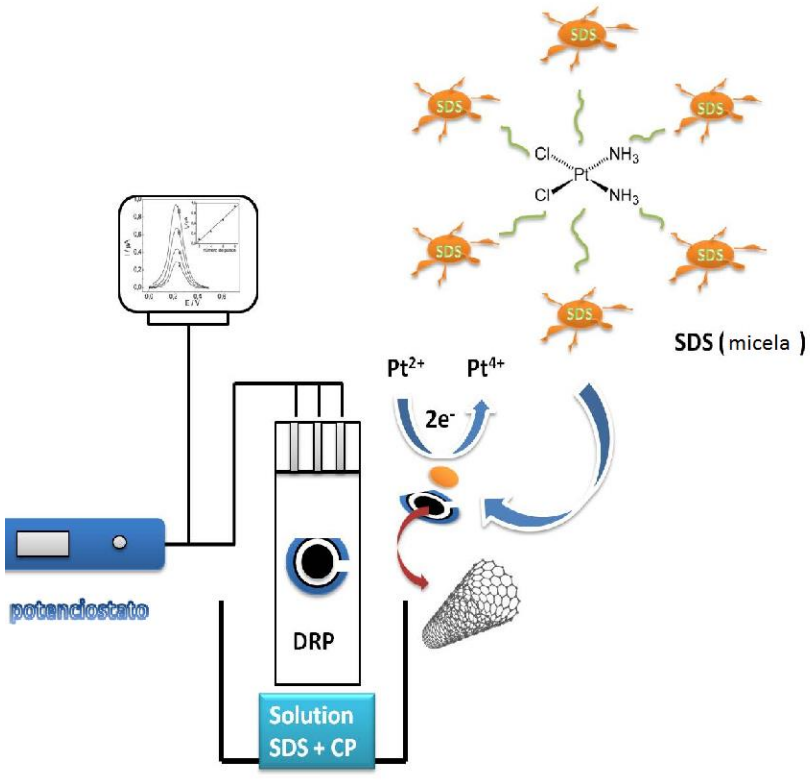
Figura 34: Mecanismo da formação de micelas com a cisplatina



O tempo de pré-concentração de 50 segundos a um potencial de -0,5 V do processo de redissolução DPV seria determinante para levar até a superficie do eletrodo (negativamente carregado) as micelas formadas pelo fármaco e o surfactante, o qual após a varredura anódica apresenta um pico em -0.25 V, o que corresponde para a oxidação de Pt (II) a Pt (IV) (Figura 27A, ELFERINK et al, 1987).

Todo este processo parece ser muito eficaz, para as determinações quantitativas e de forma direta de cisplatina pelo método proposto baseado num sensor de MWCNT-COOH/SPE/SDS e cujos resultados foram comparáveis aos mostrados pela HPLC. Em apoio ao modelo proposto, a quantificação dos fármacos anti-câncer que não formam espécies ionizadas em solução não foi eficaz usando este método (Figuras 30 e 32).

Figura 35: Esquema ilustrativo do funcionamento do sensor/SDS na presença de cisplatina

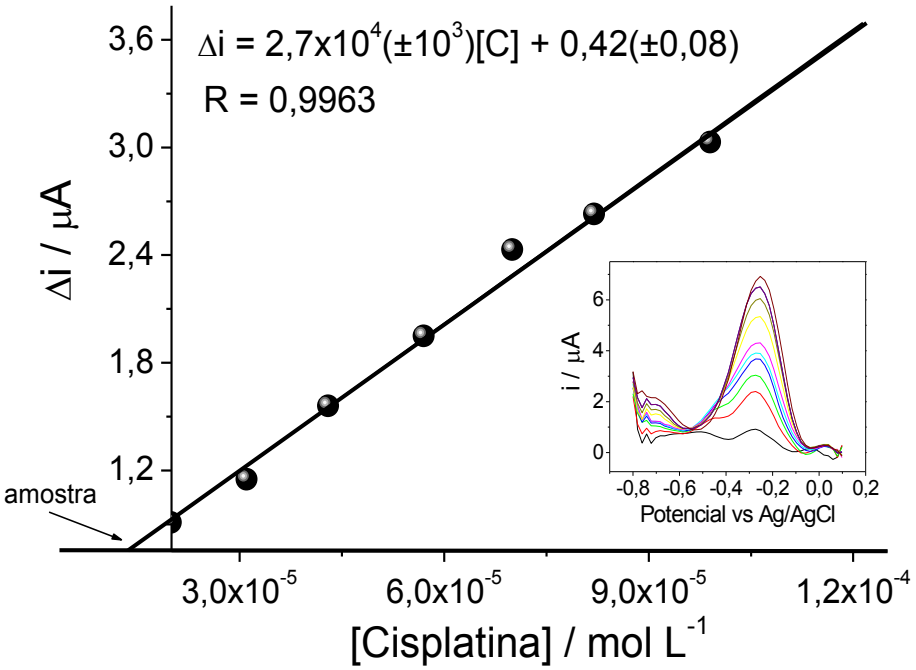


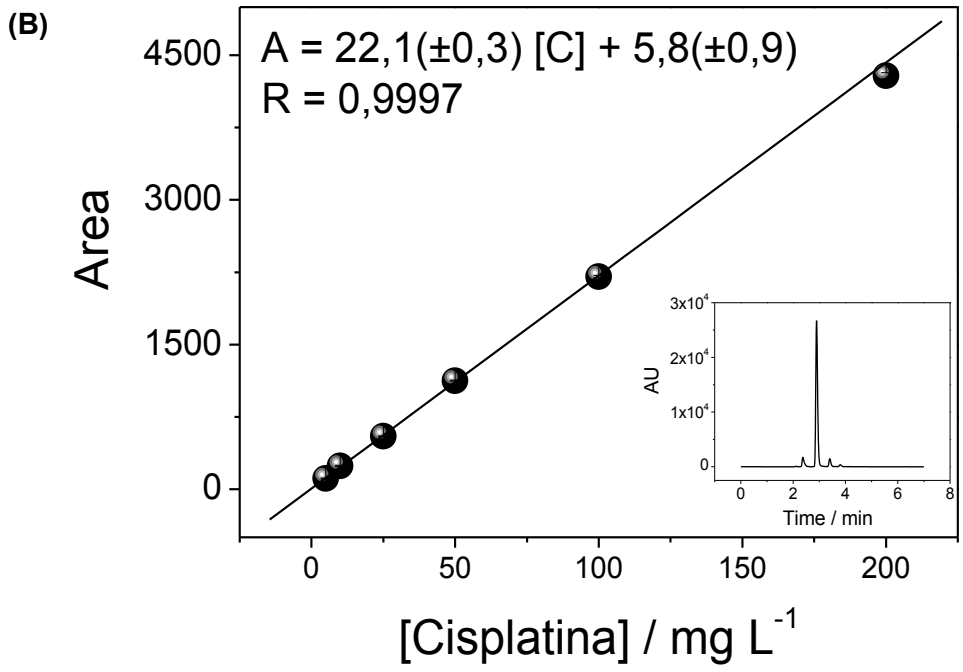
4.2.6. APLICAÇÃO DO SENSOR EM AMOSTRAS DE SORO BIOLÓGICO

O sensor foi avaliado em três amostras de soro sanguíneo enriquecidas com cisplatina. Os resultados foram avaliados utilizando os valores de recuperação de cada amostra, que foram obtidos em DPV pelo método de adição de padrão. A Figura 36A e 36B mostra respectivamente, uma curva típica obtida com o sensor usando DPV e uma curva analítica obtida pela cromatografia líquida de alta eficiência, que foi usado como método comparativo.

Figura 36: Determinação da cisplatina por método de adição de padrão de amostras de soro (A) usando o sensor proposto em eletrolito suporte de 0,1 mol L^{-1} de NaCl (pH 7,0). (B) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

(A)





Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação realizados utilizando amostras de soro apresentaram recuperação de cerca de 100%, o que indica que não houve efeito de matriz para este tipo de amostra, indicando que o sensor é adequado para a quantificação seletiva de cisplatina nessa matriz (Tabela 4). Adicionalmente, quando foram comparados os resultados obtidos pelo sensor com o método cromatográfico, usado como referência, os valores obtidos para os erros relativos foram pequenos, validando a metodologia proposta.

Amostras de soro humano	[Cisplatina] / mol L^{-1}			Erro % (Sensor/HPLC)
	Adicionado	Sensor proposto	Método de comparação	
1	$1,50 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-5}$	3,2
2	$1,50 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	4,4
3	$1,50 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-5}$	7,5

Tabela 4: Comparação do sensor com o método cromatográfico (HPLC).

Na literatura tem-se encontrado alguns métodos de determinação de cisplatina (Tabela 5). Pode-se vizualizar que este trabalho apresentou limite de detecção comparavel com os métodos já publicados, com a vantagem de que este sensor é descartável, de baixo custo, análise rápida, sem etapas prévias de pré-tratamento de amostra, mão de obra não especializada, alta sensibilidade, estabilidade e com a possibilidade de produção em massa e de se tornarem portáteis.

Método	Limite de deteção (μmol L^{-1})	Referência
Espectroscopia de AA, forno de grafite	0,10	(KANGARLOO et al,2004)
HPLC (fase reversa, detecção ultravioleta)	47,0	(RAMOS et al, 2011)
LC-MS	0,030	(YAROSHENKO et al, 2013)
Sensor MWNTs/GCE	39,0	(FANG et al, 2011)
Sensor de GO-MWNTs/GCE	0,21	(YE et al, 2014)
Biosensor com Metalotioneína	0,50	(PETRLOVA et al.,2006)
Biosensor com GST	8,8	(MATERÓN et al.,2014)
Sensor SPE/MWNT-COOH	4,6	(MATERÓN et al.,2014)

GO: óxido de grafeno; GCE: eletrodo de carbono vítreo; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; GST: Glutationa-*s*-transferase.

5. CONCLUSÕES

5.1 Os resultados obtidos com a enzima GST imobilizada na superfície do eletrodo permitiram a determinação analítica do fármaco cisplatina de forma satisfatória.

5.1.1 O biossensor empregando a enzima GST permitiu estudar a interação desta enzima com os diferentes fármacos empregados na terapia tumoral usando ferramentas analíticas.

5.1.2 O uso do eletrodo de pasta de carbono ofereceu a possibilidade de uma simples, rápida e eficiente renovação da camada de superfície do eletrodo, permitindo a utilização da mesma pasta de carbono modificada em várias medidas durante um longo período de tempo (15 dias).

5.1.3 O biossensor desenvolvido mostrou-se uma ferramenta satisfatória no monitoramento da cisplatina, apresentando características vantajosas como alta sensibilidade e baixo custo, quando comparado a outros métodos de detecção. Adicionalmente, trata-se do primeiro biossensor eletroquímico reportado na literatura para detecção de antitumorais usando a enzima GST, tornando-o pioneiro nesta área de pesquisa.

5.2 O sensor impresso modificado com MWCNT-COOH apresentou resultados satisfatórios em relação a sua sensibilidade, e principalmente à estabilidade e seletividade conseguidas ao introduzir SDS nas análises eletroquímicas.

5.2.1 O sensor apresentou um carater seletivo quando comparado com outros fármacos à base de platina, como carboplatina, oxaliplatina, doxorrubicina e gemcitabina. Quando aplicado em amostras de soro sanguíneo enriquecidas com cisplatina, os resultados obtidos na recuperação de cada amostra foram compatíveis com o método comparativo (HPLC).

5.2.2 O desenvolvimento de um sensor impresso para determinação de cisplatina abre a possibilidade de medidas rápidas, simples e confiáveis.

5.3 Cabe ressaltar que a literatura carece de trabalhos deste tipo, e por esta razão a pesquisa realizada neste doutorado abre uma importante linha de atuação na qual ainda há muito por fazer.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Understanding the life of cycle cellular**. 2015 Disponivel em : <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-cell-cycle>. Accesso em: 18 fev. 2015.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**, v; 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANDREESCU, S.; SADIK, O. A. Advanced electrochemical sensors for cell cancer monitoring. **Methods**, v. 37, n. 1, p. 84-93, Sept. 2005.

ARNDT, S. et al. Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 583-594, 2004.

ATTA, N. F. et al. Effect of surfactants on the voltammetric response and determination of a antihypertensive drug. **Talanta**, v. 72, p.1438-1445, 2007.

BAGHERI, A.; HOSSEINI, H. Electrochemistry of raloxifene on glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical formulations and human plasma. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 164-170, 2012.

BARNES-PRICE, S. J.; APPLETON, T.G. **Platinum-based drugs in cancer therapy**. Totowa: Human Press, 2000.

BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BIETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 1-23, 2015.

BATCHELOR-McAULEY, C. et al. New electrochemical methods. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 669-684, 2012.

BELL, D. N. et al. Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of. Chromatography B**: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 837, n. 1/2, p. 29-34, 2006.

BERNARD, V. et al. Determination of free cisplatin in medium by differential pulse polarography after ultrasound and cisplatin treatment of a cancer cell culture. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 48, n. 1, p. 59-62, 2011.

BOSCH, M. E. et al. Analytical methodologies for the determination of cisplatin. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 47, p. 451-459, 2008.

BRETT, M. A. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica**: princípios, métodos e aplicações. Coimbra: Almedina, 1996.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Porto alegre, Mc Graw Hill, 12 ed, 2012.

BURGER, K. N. J. et al. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. **Nature Medicine**, v. 8, n. 1, p. 81-85, 2002.

CALEY, A.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, v. 30, n. 4, p. 186-190, 2012.

CEPEDA, V. et al. Biochemical mechanism of cisplatin cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3-18, 2007.

CHANDRA, P. Electrochemical sensor have been developed employing various fabrication methods, such as photolithography, screen-printing and ink-jet printing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, p. 326-332, 2011.

CHANDRA, P. et al. Ultrasensitive detection of drug resistant cancer cells in biological matrixes using an amperometric nanobiosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 418-425, 2015.

CHEN, H. H. W.; KUO, M. T. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. **Metal-Based Drugs**, v. 2010, p.1-7, 2010.

CONGUR, G.; ERDEM, A.; MESE, F. Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable grafite electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 102, p. 21-28, 2015.

COTRIM, C. A. et al. Sintese, caracterização e estudo de interação de um análogo da antitoxina CcdA empregando fluorescência no estado estacionário. **Quimica nova**, v. 33, n. 4, p. 2010.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L.F.C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, 2015. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.011. In press.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research,** v. 68, n. 21, p. 8643-8654, 2008.

DEVLIN, M. T. **Manual de bioquímica com correlações clinicas**. 7. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2011.

DE WAAL, W. A. J.; MAESSEN, F. J. M. J.; KRAAK, J. C. Analytical methodologies for the quantitation of platinum anti-cancer drugs and related compounds in biological media. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 1-30, 1990.

DIACONU, J. et al. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p.128-138, 2013.

DIGUA, K.; KAUFFMAN, J. M.; DELPLANCKE, J. L. Surfactant modified carbon paste electrode: Part 1: Electrochemical and microscopic characterization. **Electroanalysis**, v**.** 6, n. 5-6, p. 451-458, 1994.

DIGUA, K.; KAUFFMANN, J. M.; KHODARI, M. Surfactant modified carbon paste electrode. Part 2: analytical performances. **Electroanalysis**, v. 6, n. 5/6, p.459-462, 1994.

DZAMITIKA, S. et al. Preferential energy and potential-dependent accumulation of cisplatin glutathione complexes in human cancer cell lines (GLC4 and K562): a likely role of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 38, n. 1, p.11-21, 2006.

ELFERINK, F. et al. Electrochemistry of platinum complexes. Part 1. Polarographic reduction mechanism with reference to electrochemical detection. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 238, p. 297-313, 1987.

EL-KHATEEB, M. et al. Development of HPLC conditions for valid determination of hydrolysis products of cisplatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 3, p. 319-326., 1999.

EL-MAALI, A. N. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 1, p. 99-107, Aug. 2004.

ENACHE, A; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical evaluation of glutathione-s-transferase kinetic parameters. **Bioelectrochemistry**, v. 101, p. 46-51, 2015.

ERDEM, A.; KARADENIZ, H.; CALISKAN, A. Single-walled carbon nanotubes modified graphite electrodes for electrochemical monitoring of nucleic acids and biomolecular interactions. **Electroanalysis**, v. 21, n. 3/5, p. 464-471, 2009.

FARIDBOD, F.; GUPTA, V. K.; ZAMANI, H. A. Electrochemical sensor and biosensors. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2011, 2011. doi:104061/2011/352546.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39,1992.

FENG, Q.; LI, N. Q.; JIANG, Y. Y. Enhanced sensitivity for deoxyribonucleic acid electrochemical impedance sensor: gold nanoparticles/polyaniline nanotube membranes. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, p. 97-104, 1997.

FERNANDO, J.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, v. 33, n. 3, p. 131-135, 2015.

FLOREA, A. et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. **Talanta**, v. 138, p. 71-76, 2015.

GOWDA, J. L. et al. Fabrication of multi-walled carbon nanotube-surfactant modified sensor for the direct determination of toxic drug 4-aminoantipyrine. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2015. doi:10.1016/j.jpha.2015.01.001. In press.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensor-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p.1400-1458, 2008.

GUO, S. et al. Lipid-coated cisplatin nanoparticles induce neighboring effect and exhibit enhanced anticancer efficacy. **ACS Nano**, v. 7, n. 11, p. 9896-9904, 2013.

GUPTA, V. K. et al. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 179-196, 2011.

HABIG, W. H. et al. The identify of Glutathione-s-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 10, p. 3879-3882, Oct. 1974.

HAGRMAN, D.; GOODISMAN, J.; SOULD, A. K. Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 608-666, 2004.

HAMELERS, I. H; de KROON, A. L. Nanocapsules: a novel formulation platform for platinum-based anti-cancer drugs. **Journal of Liposome Research**, v. 17, n. 3/4, p. 183-189, 2007.

HARWOOD, G. W. J.; POUTON, C. W. Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 2, p. 163-191, 2006.

HAYAKAWA, T. S.; UNDENFRIEND, H. Y.; JERINA, D.M. Substrates and inhibitors of hepatic glutathione-s-epoxi-transferase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, n. 2, p. 438-451, 1975.

HERNANDEZ-SANTOS, P.; GONZALES-GARCIA M. B.; COSTA- GARCIA, A. Effect of metals on silver electrodeposition: application to the detection of cisplatin. **Electrochimica Acta**, n. 50, p. 1895-1902, 2005.

HOPTER, M. S. et al. Direct analysis of platinum in plasma and urine by electrothermal atomic absorption spectrophotometry. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 19, n. 6, p. 389-396, 1989.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. de. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 3, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUNG, V. W. S. et al. Electrochemical impedance spectroscopy for monitoring caspase-3 activity. **Electrochimica Acta**, v. 162, p. 79-85, 2015.

IBRAHIM, M. S. Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA. **Analytica Chimica Acta**, v. 443, p. 63-72, 2001.

ISHIKAMA, T,; ALI-OSMAN, F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 27, p. 20116-20125, 1993.

JACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, J. B. Review: carbon nanotubes based electrochemical sensor for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 2, p. 105-107, 2010.

JAIN, R.; MISHRA, R.; DWIVEDI, A. Effect of surfactant on voltammetric behavior of Ornidazole. **Colloids and Surfaces A:** Physicochemical and Engineering Aspects, v. 337, p. 74-79, 2009.

JESUS, C. S. H.; DICULESCU, V. C. Redox mechanisms spectrophotometrical characterization and voltammetric determination in serum samples of kinases inhibitor and anticancer drug desatinib. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 752, p. 47-53, 2015.

JOHANSSON A. S.; RIDDERSTRÒN, M.; MANNERVIK, B. The human glutathione transferase P_1-1 specific inhibitor TER 117 designed for overcoming cytostatic-drug resistance is also a strong inhibitor of glyoxalase I. **Molecular Pharmacology**, n. 57, p. 619-624, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAMBLE, P. R.; KULKARNI, S.; BHIWGADE, D. A. Comparitive studies of glutathione-s-transferase kinetics in control, cisplatin and etoposide treated hepatic and renal tissue of male rat. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 121-123, 2012.

KARADAS, N. et al. Analytical application of polymethylene blue-multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode on anticancer drug irinotecan and determination of its ionization constant value. **Talanta**, v. 115, p. 911-919, 2013.

KARGARLOO, S. B., Bioassay for determination of cisplatin activity in serum and urine. **Turkish Journal of Cancer**, v. 34, n. 2, p. 71-74, 2004.

KARTALOU, M; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutation Research**, n. 478, p. 23-43, 2001.

KARWICKA, E. Role of glutathione in the multidrug resistance in cancer. **Advances in Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 104-123, 2010.

KHIATI, S. et al. Nucleoside-Lipid-based nanoparticles for cisplatin delivery. **ACS Nano**, v. 5, n. 11, p. 8649-8655, 2011.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical sensor and biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2012.

KRIZKOVA, S. et al. An adsorptive transfer technique coupled with Brdicka reaction to reveal the importance of metallothionein in chemotherapy with platinum based cytostatics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p. 4826-4842, 2010.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: and historical perspective and an update. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.

LI, H. B. et al. Sodium dodecyl sulfate electrochemical method for sub-picomole level determination of topotecan hydrochloride at a novel disposable electrode. **Science China**: Chemistry, v. 54, n. 1, p. 217-222, 2011.

LIU, J.; QIN, Y.; LI, D. Highly sensitive and selective detection of cancer cell with a label-free electrochemical cytosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 436-441, 2013.

LIU, S. et al. Study on the interaction between DNA and protein induced by anticancer drug cisplatin. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.63, n.32, p. 125-136, 2005

LOCATELLI, C. Voltammetric analysis of trace levels of platinum group metals-principles and applications. **Electroanalysis**, v. 19, n. 21, p. 2167-2175, 2007.

LUQMAN, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v. 14, n. 1, p. 35-48, 2005.

MACKAY, R. A. Electrochemistry in association colloids. **Colloids and Surfaces**, v. 82, n. 1, p. 1-28,1994.

MARIN, D. et al. Voltammetric determination of mitomycin C in the presence of other anti-cancer drugs and in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 358, p. 45-50, 1998.

MARQUES, R. C. B. et al. Electrochemical immunosensor for the analysis of the breast cancer biomarker HER2 ECD. **Talanta**, v. 129, p. 594-599, 2014.

MASAYUKI, Y. et al.. Introduction of Cisplatin into polymeric micelle. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2-3, p. 351-356, 1996.

MASTERS, J. R. W. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 19, p. 297-305, 1990.

MATERON, E. M et al. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 232-236, 2014.

MATERON, E. M. et al. Multi-walled carbon nanotube modified screen-printed electrodes for cisplatin detection. **Electrochimica Acta**, v. 158, p. 271-276, 2015.

MATHEW, D. H. et al. The cellular distribution and oxidation state of platinum (II) and platinum (IV) antitumor complexes in cancer cells. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8,.n. 7, p. 726-732, 2003.

MIAO, P. et al. Peptide based electrochemical approach for apoptosis evaluation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, p. 99-101, 2014.

NGUYEN, T. T. Metallomics in drug development: characterization of a liposomal cisplatin drug formulation in human plasma by CE-ICP-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 6, p. 1845-1854, 2013.

NIRANJA, E. et al. Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 631, n. 1/2, p. 1-9, 2009.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: a review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265-2289, 2011.

PATTAR, V. P.; NANDIBEWOOR, S. T. Electroanalytical method for the determination of 5-fluorouracil using a reduce graphene oxide/chitosan modified sensor. **RSC Advances**, v. 5, p. 34292-34301, 2015.

PETRLOVA, J. et al. Cisplatin electrochemical biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 51 n. 24, p. 5169-5173, 2006.

POTAPOVA, O. et al. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14041-14044, 1997.

RAMOS, Y. et al. Optimization of a HPLC procedure for simultaneous determination of cisplatin and the complex cis,cis,trans-diamminedichlorodihydroxoplatinum(iv) in aqueous solutions. **Quimica Nova**, v. 34, n. 8, p. 1450-1454.

RASOOLY, A.; JACOBSON, J. Development of biosensor for cancer clinical testing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1851-1858, 2006.

RAUF, S. et al. Electrochemical approach of anticancer drug-DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**. v. 37, n. 23, p. 205-217, 2005.

RAVERA, M. et al. Electrochemical evaluation of the interaction between antitumoral titanocene dichloride and biomolecules. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, p. 1303-1306, 2009.

RHIEY, S. Y. et al. Direct electrochemistry of cytochrome P 450 27G in surfactant films. **Electrochemistry Communications**, v. 11, p. 1857-1860, 2009.

RILEY, C. M. Bioanalysis of cisplatin analogues - a selective review. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 6, n. 6/8, p. 669-676, 1988.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P., BENITEZ-BRIBIESCA, L. Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. **Cancerología**, p. 187-199, 2006.

SIQUEIRA, J. R. et al. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1254-1263, 2010.

SORSA, M.; ANDERSON, D. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. **Mutation Research**, v. 355, p. 253-261, 1996.

SORSA, M.; HEMMINKI, K.; VARNIO, H. Occupational exposure to anticancer drugs-potential and real hazards. **Mutation Research**, v. 154, p. 135-149, 1985.

SOUID, A. K. et al. Phase I clinical and pharmacologic study of weekly cisplatin and irinotecan combined with amifostine for refractory solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 703-771, 2003.

STETTER, R. J.; PENROSE, R. W.; YAO, S. Sensor, chemical sensor, electrochemical sensor and ECS. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 150, n. 2, p. 511-516, 2003.

TABOADA, M. P. T. S. et al. Influence of gamma irradiation on a natural source of peroxidase and its effect in the reagentless amperometric biosensor for hydrogen peroxide. **Analyst**, n. 126, p. 739-742, 2001.

TERADAL, N. L. et al. Electrochemical investigations of an anticancer drug in the presence of sodium dodecyl sulfate as an enhancing agent at carbon paste electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, n.11, p. 917-923, 2012.

TESTA, B.; MAYER, J. M. **Hydrolysis in drug and prodrug metabolism:** chemistry, biochemistry and enzymology. Zurich: Wiley-VCH, 2003.

TEZCANA, S. et al. High performance liquid chromatographic determination of free cisplatin in different cancer types. **Der Pharma Chemica**, v. 5, n. 5, p. 169-174, 2013.

TIAN, X. et al. Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 18-22, 2008.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. the role of glutathione-s-transferase in anticancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369-7375, 2003.

TURCI, R. et al. Validation protocol and analytical quality in biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs. **Toxicology Letters**, v. 162, p. 256-262, 2006.

UCHINO, H. et al. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 6, p. 678-687, 2005.

USLU, B.; OZCAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, n. 5, p. 817-853, 2017.

VALEZI, C. F. et al. An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 205, p. 234-243, 2014.

VERSCHRAAGEN, H. et al. Simultaneous determination of intact cisplatin and its metabolite monohydrated cisplatin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 772, n. 2, p. 273-281, 2002.

VITTAL, R.; GOMATHI, H.; KIM, K. I. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and the modification of electrodes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 119, p. 55-68, 2006.

WANG, J. Recent advances in stripping analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 5, p. 508-511, 1990.

WANG, R. et al. Highly sensitive detection of cancer by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 61, p. 179-184, 2012.

YAPASAN, E. et al. Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors. **Materials Science and Engineering B**, v. 169, p. 169-173, 2010.

YAROSHENKO, D. V.; GRIGORIEC, A. V.; SIDOROVA, A. A.; KARTSOVA, L. A. Determination of cisplatin in blood plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 156-160, 2013.

YE, L. et al. Electrochemical determination of cisplatin in serum at graphene oxide/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 1537-1546, 2014.

YOTSUUANAGI, Y. et al. Computational consideration of cisplatin hydrolisis and acid dissociation in aqueous media: effect of total drug concentrations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1/2, p. 95-104, 2002.

ZABLOTOWICZ, R. M. et al. Glutathione-s-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1054-1060, 1995.

ZHANG, S.; WU, K.; HU, S. Voltammetric determination of diethylstilbestrol at carbon paste electrode using cetylpyridine bromide as medium. **Talanta**, v. 58, p. 747-754, 2002.

ZIYATDINOVA, G.; ZIGANSHINA, E.; BUDNIKOV, H. Surfactant media for constant-current coulometry, application for the determination of antioxidants in pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 23-28, 2012.