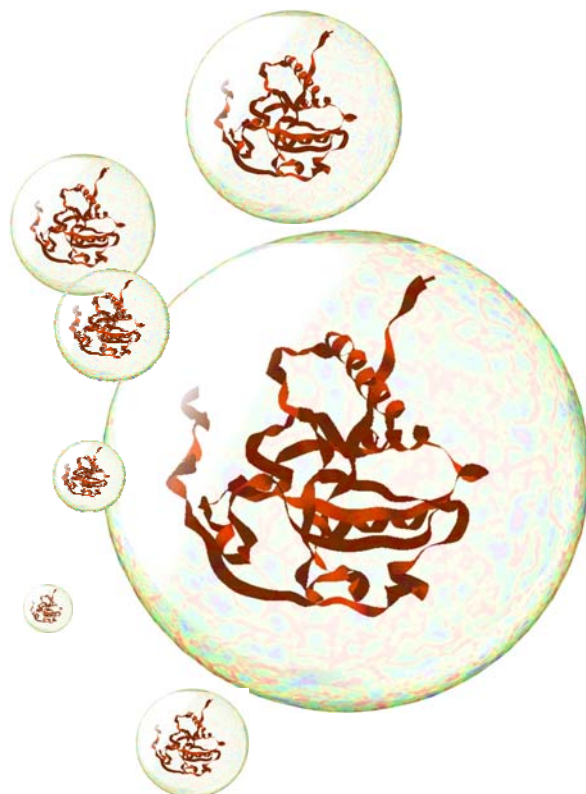




TEODOR ADRIAN ENACHE

**MECANISMOS REDOX DE COMPOSTOS
AROMÁTICOS, AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS,
EM ELÉCTRODOS DE CARBONO**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

2011

TEODOR ADRIAN ENACHE

**MECANISMOS REDOX DE COMPOSTOS
AROMÁTICOS, AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS, EM
ELÉCTRODOS DE CARBONO**

**Dissertação submetida à Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra
para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica,
especialidade Toxicologia Bioquímica**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

2011

"A soap bubble is round because it is the most energy-efficient configuration."

K-PAX (2001)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, desejo expressar os meus profundos agradecimentos à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett pela oportunidade concedida e confiança manifestada, bem como pela orientação, apoio científico e a disponibilidade ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Christopher Michael Ashton Brett pela sua crítica positiva e os seus úteis conselhos no decorrer dos anos de doutoramento.

À Professora Doutora Laura Țugulea quero agradecer a contribuição decisiva na minha formação académica.

Agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, bolsa de doutoramento SFRH / BD / 37231 / 2007 e ao Instituto Pedro Nunes pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

Aos meus amigos colegas de laboratório do Instituto Pedro Nunes, Paulina, Dora, Isabel, Carlos e Patricia, assim como do laboratório no Departamento de Química, Madi, Madalina, e Edilson, pela amizade e o apoio constante, e particularmente ao Victor e à Ana pelo bom conselho na escrita da tese e o auxílio permanente ao longo destes anos.

Agradeço especialmente à minha família pelo amor, carinho, compreensão e o apoio que sempre me ofereceram.

A todos o meu

OBRIGADO

RESUMO

As reacções redox e os mecanismos de oxidação de diferentes compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas foram investigados utilizando os eléctrodos de carbono vítreo (GCE) e de diamante dopado com boro (BDDE).

As propriedades do BDDE, em particular a geração electroquímica *in situ* de radicais hidróxilo, foram investigadas por voltametria de impulso diferencial, em diferentes soluções de electrólito de suporte.

Os mecanismos de oxidação do fenol, do indol e dos derivados *para*-substituídos de fenol e C3 substituídos de indol foram propostos.

Um estudo comparativo da oxidação electroquímica da aspirina e do triflusal, antes e depois da sua hidrólise em água e em meio alcalino, foi efectuado utilizando GCE e BDDE.

A oxidação electroquímica da sanguinarina e da berberina foi investigada e os seus centros electroactivos foram determinados, o que permitiu uma melhor compreensão dos processos redox destes alcalóides, com implicações no conhecimento dos seus importantes propriedades biológicas.

O comportamento anódico dos aminoácidos electroactivos foi investigado por métodos electroquímicos utilizando GCE e BDDE e os seus mecanismos de oxidação foram identificados. A oxidação da tirosina está relacionada com a oxidação do grupo fenol, envolvendo a formação de um radical fenóxido, enquanto que as reacções de transferência de carga do triptofano ocorrem nos grupos pirrol e benzeno. Os resultados voltamétricos obtidos para histidina, cisteína e metionina mostraram que o mecanismo de oxidação destes aminoácidos nos GCE e BDDE segue o mesmo caminho da oxidação *in vivo*.

Devido aos seus resíduos oxidáveis de tirosina, triptofano e histidina, a proteína metionina sulfóxido reductase A sofre oxidação electroquímica nos GCE e BDDE. O estudo do comportamento voltamétrico desta proteína forneceu informações não apenas sobre o seu mecanismo de oxidação, mas também sobre os processos de adsorção na superfície dos eléctrodos.

ABSTRACT

The redox reactions and the oxidation mechanisms of different aromatic compounds, amino acids and proteins were investigated at glassy carbon (GCE) and boron doped diamond (BDDE) electrodes.

The BDDE properties, especially related with the *in situ* electrochemical generation of hydroxyl radicals, were investigated by differential pulse voltammetry in different electrolyte solutions.

The oxidation mechanisms of phenol, indol, and *para*-substituted phenols and C3-substituted indols were proposed.

A comparative study between the electrochemical oxidation of aspirin and triflusal at GCE and BDDE, before and after hydrolysis in water and alkaline conditions, was performed.

The electrochemical oxidation of sanguinarine and berberine was investigated and the electroactive centers were identified, allowing a better understanding of the redox processes of these alkaloids, with implications for understanding their important biological properties.

The anodic behaviour of the electroactive amino acids was investigated using electrochemical methods at GCE and BDDE, and their oxidation mechanisms were established. The oxidation of tyrosine is related to the oxidation of the phenol group, involving the formation of a phenoxil radical, while the charge transfers reactions of tryptophan occur at the pyrrole and benzene groups. The voltammetric results obtained for histidine, methionine and cysteine showed that the oxidation mechanisms of these amino acids at GCE and BDDE follow the same oxidation pathway as *in vivo*.

The protein methionine sulfoxide reductase A undergoes electrochemical oxidation at GCE and BDDE, due to the oxidation of its tyrosine, tryptophan and histidine residues. The studies of the voltammetric behavior of this protein not only provided information about its oxidation mechanism, but also about the adsorption process on the surface of the electrodes.

ÍNDICE

NOTAÇÃO: SÍMBOLOS PRINCIPAIS	1
SUBSCRITOS.....	2
ABREVIATURAS	2
CONSTANTES FÍSICAS FUNDAMENTAIS	3

Capítulo 1

Introdução	5
1.1 INTRODUÇÃO	7
1.2 COMPOSTOS AROMÁTICOS	9
1.2.1 Fenóis	9
1.2.2 Ácido acetilsalicílico e triflusal	12
1.2.3 Indóis	13
1.2.4 Berberina e sanguinarina	15
1.2.4.1 Berberina	15
1.2.4.2 Sanguinarina	17
1.3 AMINOÁCIDOS	19
1.3.1 Estrutura dos aminoácidos. Propriedades físico-químicas	19
1.3.2 Propriedades electroquímicas dos aminoácidos	23
1.4 PROTEÍNAS	24
1.4.1 Estrutura das proteínas	26
1.4.2 Oxidação das proteínas <i>in vivo</i>	29
1.4.2.1 Radicais livres	30
1.4.2.2 Interação entre as proteínas e os radicais livres	31
1.4.2.3 Metionina sulfóxido reductase A	34
1.4.3 Propriedades electroquímicas das proteínas	35
1.5 PRINCÍPIOS DA ELECTROQUÍMICA	39
1.5.1 Eléctrodos de carbono	42
1.5.1.1 Eléctrodo de carbono vítreo	43
1.5.1.2 Eléctrodo de diamante dopado com boro	44

1.5.2 Métodos voltamétricos	45
1.5.2.1 Voltametria cíclica	45
1.5.2.2 Voltametria de impulso diferencial	51
1.5.2.3 Voltametria de onda quadrada	53

Capítulo 2

Experimental	55
2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	57
2.2 INSTRUMENTAÇÃO	60
2.3 PARÂMETROS VOLTAMÉTRICOS	61
2.4 CÉLULA ELECTROQUÍMICA	61
2.5 TRATAMENTO DOS DADOS	64

Capítulo 3

Eléctrodo de diamante dopado com boro	67
3.1 INTRODUÇÃO	69
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	70
3.3 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA	72
3.4 CONCLUSÕES	77

Capítulo 4

Estudo voltamétrico de compostos fenólicos	79
4.1 INTRODUÇÃO	81
4.2 FENOL	82
4.2.1. Voltametria cíclica	82
4.2.2 Voltametria de impulso diferencial	84
4.2.3 Voltametria de onda quadrada	89

4.3 DERIVADOS DO FENOL <i>PARA</i> -SUBSTITUÍDOS	91
4.3.1 Voltametria de impulso diferencial	92
4.3.2 Voltametria de onda quadrada.....	94
4.4 MECANISMOS DE OXIDAÇÃO	97
4.5 CONCLUSÕES	99

Capítulo 5

Estudo voltamétrico do ácido acetilsalicílico e do triflusal	101
5.1 INTRODUÇÃO	103
5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV/VIS	104
5.3 VOLTAMETRIA	107
5.3.1 Eléctrodo de carbono vítreo	107
5.3.2 Eléctrodo de diamante dopado com boro	113
5.4 CONCLUSÕES	118

Capítulo 6

Estudo voltamétrico de compostos indólicos	121
6.1 INTRODUÇÃO	123
6.2 INDOL	124
6.3 DERIVADOS DE INDOL C3 SUBSTITUÍDOS	130
6.4 MECANISMOS DE OXIDAÇÃO	134
6.5 CONCLUSÕES	138

Capítulo 7

Estudo voltamétrico da berberina e sanguinarina	139
7.1 INTRODUÇÃO	141

7.2 BERBERINA.....	142
7.2.1 Voltametria cíclica	142
7.2.2 Voltametria de impulso diferencial	144
7.2.3 Voltametria de onda quadrada.....	151
7.2.4 Mecanismo de oxidação	154
7.3 SANGUINARINA.....	157
7.3.1 Voltametria cíclica	157
7.3.2 Voltametria de impulso diferencial	160
7.3.3 Voltametria de onda quadrada.....	166
7.3.4 Mecanismo de oxidação	168
7.4 CONCLUSÕES	169

Capítulo 8

Estudo voltamétrico da tirosina, triptofano e histidina	171
8.1 INTRODUÇÃO.....	173
8.2 TIROSINA E POLI-TIROSINA	175
8.2.1 Tirosina.....	175
8.2.2 Poli-tirosina	179
8.2.3 Mecanismo de oxidação	181
8.3 TRIPTOFANO E POLI-TRIPTOFANO.....	181
8.3.1 Triptofano.....	182
8.3.2 Poli-triptofano	186
8.3.3 Mecanismo de oxidação	187
8.4. HISTIDINA	189
8.4.1 Voltametria cíclica	189
8.4.2 Voltametria de impulso diferencial	191
8.4.3 Mecanismo de oxidação	194
8.5 CONCLUSÕES	195

Capítulo 9

Estudo voltamétrico da cisteína e da metionina	197
9.1 INTRODUÇÃO	199
9.2 CISTEÍNA	200
9.2.1 Voltametria cíclica	200
9.2.2 Voltametria de impulso diferencial	203
9.2.3 Mecanismo de oxidação	207
9.3 METIONINA.....	207
9.3.1 Voltametria cíclica	208
9.3.2 Voltametria de impulso diferencial	209
9.3.3 Mecanismo de oxidação	213
9.4 CONCLUSÕES	214

Capítulo 10

Oxidação electroquímica da metionina sulfóxido reductase A	215
10.1 INTRODUÇÃO	217
10.2 OXIDAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO GCE	219
10.2.1 Voltametria cíclica	219
10.2.2 Voltametria de impulso diferencial	220
10.3 OXIDAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO BDDE	223
10.4 A ADSORÇÃO E A OXIDAÇÃO DA MsrA.....	225
10.5 CONCLUSÕES	228

Capítulo 11

Conclusões	229
-------------------------	-----

Bibliografia	237
---------------------------	-----

Notação: Símbolos Principais

		<i>Unidades</i>
A	área	m^2
C	concentração	mol cm^{-3} (M)
e	carga do electrão	C
E	potencial de eléctrodo	V
	$E^{\theta'}$ potencial formal	
	E_p potencial de pico	
E_F	energia de Fermi	eV
E_{redox}	energia do par redox	eV
f	frequência	Hz
I	corrente eléctrica	A
	I_b corrente inversa (<i>backward current</i>)	
	I_C corrente capacitiva	
	I_f corrente faradaica	
	I_f corrente directa (<i>forward current</i>)	
	I_p corrente de pico	
	I_t corrente total	
k	constante de velocidade heterogénea	m s^{-1}
	k_0 constante de velocidade padrão	
	k_a constante de velocidade de oxidação	
	k_a constante de velocidade de redução	
n	número de electrões transferidos	—
t	tempo	s
T	temperatura	K
$W_{1/2}$	largura a meia-altura do pico	mV
α	coeficiente de transferência de carga	—
Γ	concentração superficial	mol m^{-2}
v	velocidade de varrimento	V
τ	tempo	s
λ	comprimento de onda	nm

Subscritos

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

Abreviaturas

ASA	ácido acetilsalicílico
AFM	microscopia de força atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
BDDE	eléctrodo de diamante dopado com boro (<i>Boron Doped Diamond Electrode</i>)
Cys	cisteína
DP	impulso diferencial (<i>Differential Pulse</i>)
GCE	eléctrodo de carbono vítreo (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
His	histidina
HTB	ácido 2-hidróxi-4-(triflorometil) benzóico
IAA	ácido indol acético
IAM	indol-3-acetamida
IBA	ácido indol butírico
IPA	ácido indol propiônico
Met	metionina
MsrA	metionina sulfóxido reductasa A
Poli-Y	poli-tirosina
Poli-W	poli-triptofano
SA	ácido salicílico
SEM	microscopia electrónica de varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i>).

SW	onda quadrada (<i>Square Wave</i>)
TRF	triflusal
Trp	triptofano
Tyr	tirosina

Constantes físicas fundamentais

F	constante de Faraday	$9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
R	constante dos gases ideais	$8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

Capítulo 1

Introdução

1.1 INTRODUÇÃO

O estudo da transferência de electrões em sistemas biológicos é uma das principais áreas de investigação em bioquímica e ciências biofísicas, uma vez que estas reacções desempenham um papel fundamental nas interacções biomoleculares, como conversão de energia, mecanismos de síntese de biomoléculas e complexos biomoleculares. A utilização dos métodos electroquímicos para o estudo de moléculas com relevância biológica tem o potencial de fornecer informações importantes sobre as propriedades de transferência de carga nos sistemas biológicos.

O objectivo deste trabalho insere neste contexto, na medida em que foram investigados os comportamentos electroquímicos e os mecanismos de oxidação de vários compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, utilizando os eléctrodos de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* – GCE) e de diamante dopado com boro (*boron doped diamond electrode* – BDDE). Deste modo, será apresentado e discutido o estudo electroquímico dos seguintes compostos aromáticos: fenol e alguns derivados de fenol [1], ácido acetilsalicílico (*acetilsalicylic acid* – ASA), triflusal (TRF) e os seus produtos de hidrólise [2], indol e derivados de indol [3], berberina [4] e sanguinarina [5], todos eles exibindo propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, e antioxidantes. Em seguida serão apresentados os mecanismos de oxidação dos

aminoácidos com propriedades electroquímicas tirosina [1], triptofano [3], histidina, cisteína [6] e metionina [6], e da proteína metionina sulfóxido reductase A.

No *Capítulo 1* estão descritas as propriedades físico-químicas e electroquímicas de todos compostos estudados e é feita uma descrição dos aminoácidos e das proteínas. Alguns dos princípios básicos de electroquímica, bem como uma breve descrição das técnicas e métodos experimentais utilizados no decorrer do trabalho experimental estão descritos nos *Capítulos 1 e 2*.

No *Capítulo 3* mostram-se os resultados da caracterização sistemática do BDDE utilizado durante todo o trabalho experimental, com especial atenção para os radicais hidróxilo gerados electroquimicamente *in situ* na sua superfície para potenciais positivos elevados [7].

No *Capítulo 4* estão propostos os mecanismos redox do fenol e dos seus derivados *para*-substituídos [1]. Os processos de oxidação do ASA, do TRF e dos seus metabolitos, ácido salicílico (SA) e o ácido 2-hidroxi-4-trifluorometil benzoico (HTB), estão descritos no *Capítulo 5* [2]. No capítulo *Capítulo 6* descreve-se o comportamento electroquímico do indol e dos seus derivados C3 substituídos [3]. As propriedades de transferência de electrões dos alcalóides berberina [4] e sanguinarina [5], compostos com elevada actividade farmacológica, estão descritas no *Capítulo 7*.

No *Capítulos 8 e 9* foi investigado o comportamento electroquímico dos aminoácidos com propriedades electroquímicas e propostos os seus mecanismos redox. Neste contexto, o estudo electroquímico dos aminoácidos tirosina, triptofano e histidina mostram que estes compostos contêm grupos electro-oxidáveis em eléctrodos de carbono [1, 3]. Os aminoácidos com grupos enxofre electroactivos são a cisteína e a metionina [6].

A investigação electroquímica da proteína metionina sulfóxido reductase A está descrita no *Capítulo 10* e os seus processos redox estão relacionados com o comportamento electroquímico dos aminoácidos electroactivos constituintes.

1.2 COMPOSTOS AROMÁTICOS

Ao longo deste trabalho foi estudado o comportamento electroquímico de vários compostos aromáticos, que apresentam importantes propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, e antioxidantes, cujas características principais vão ser descritas a seguir.

1.2.1 Fenóis

Devido a sua alta reactividade, os fenóis são utilizados em processos de síntese orgânica e na indústria farmacêutica [8, 9]. Os fármacos desenvolvidos a partir de compostos fenólicos mostram uma grande variedade de propriedades biológicas importantes, tais como propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, anticonvulsivas e antioxidantes [9-15].

Dos derivados de fenol *para*-substituídos destacam-se os isómeros de benzenodiol, catecol, resorcinol e hidroquinona, que entram na composição, e também são precursores de vários compostos de interesse biológico, uma vez que estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e defesa celular e também estão relacionados com grupos de hormonas, vitaminas, aminoácidos e antioxidantes [8, 9, 16].

O fenol, **Figura 1.1**, é uma molécula constituída por um grupo hidróxilo (—OH) ligado a um anel aromático.

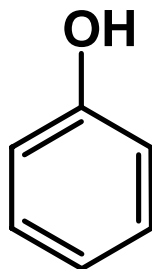


Figura 1.1 Estrutura química do fenol.

A acção antioxidante dos compostos fenólicos advém da sua capacidade de reagir com radicais livres (*free radical scavengers*). Esta propriedade é atribuída à facilidade destes compostos em perder um átomo de hidrogénio do grupo hidróxilo da molécula de fenol, num processo de transferência de um electrão e um protão, através do qual o fenol é convertido num radical fenóxido, que, por sua vez, fica também neutralizado [8, 17-19].

Devido ao grupo —OH, o fenol pode ser facilmente oxidado. O primeiro passo da oxidação dos derivados de fenol *para*-substituídos é a formação de um radical fenóxido ou de um ião fenóxido [19-21], **Figura 1.2**. Estes compostos intermediários podem participar em reacções de acoplamento, perda de protões ou ataque nucleófilico. A molécula de fenol oxidada pode sofrer uma substituição electrofílica na posição *para* e/ou *orto*, excepto quando a uma destas posições está bloqueada [19, 22, 23].

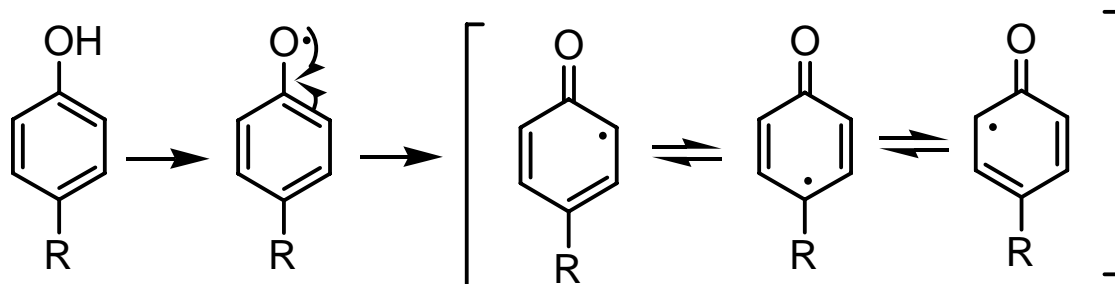


Figura 1.2 Esquema da reacção de oxidação dos fenóis *para*-substituídos, com a formação do radical fenóxido.

O comportamento electroquímico do fenol e das moléculas que contêm na sua estrutura um grupo fenol está descrito na literatura utilizando diferentes tipos de eléctrodos: ouro [24, 25], platina [24-26], carbono [25, 27-32], diamante dopado com boro [33-35], mercúrio [36] e Ti/IrO₂ [37].

Estudos por HPLC efectuados em soluções de fenol electrolisadas em eléctrodos de pasta de carbono revelaram várias espécies de hidroquinona, fenol e benzoquinona como produtos de oxidação do fenol [31].

Na superfície de BDDE, a oxidação do fenol pode ser mediada de espécies activas intermediarias de radicais hidróxilo electroquimicamente gerados para valores de potencial elevados, $E > + 2$ V. Além disso, foi demonstrada tanto a oxidação completa do fenol em CO₂, como a oxidação parcial do fenol, e à formação de outros compostos aromáticos, tais como hidroquinona, benzoquinona e catecol, em função da corrente aplicada e da concentração de fenol utilizada [34].

1.2.2 Ácido acetilsalicílico e triflusal

Os salicilatos são compostos utilizados em várias formas em medicina. No entanto, a toxicidade dos seus metabolitos requer um controlo adequado da sua posologia, através da determinação dos níveis de metabolitos no plasma sanguíneo e na urina dos pacientes que fazem uso contínuo de medicamentos contendo derivados de salicilato. Entre os métodos utilizados para determinação de salicilatos destacam-se os métodos voltamétricos, uma vez que possuem uma alta sensibilidade, baixo limite de detecção e tempo de resposta curto.

Os compostos, aspirina, [ácido acetilsalicílico – *acetilsalicylic acid* (ASA)] e, triflusal, [ácido 2-(oxiacetil)-4-(trifluorometil) benzóico (TRF)], podem prevenir a formação de coágulos sanguíneos, inibem a enzima ciclooxigenasa, reduzem a produção de tromboxano A₂, são estimuladores da agregação plaquetária, o que interfere com a formação de trombos, reduzindo assim o risco de enfarte, ataques cardíacos ou outros problemas circulatórios graves [38-43].

Nos organismos humanos, ASA e TRF são rapidamente metabolizados no fígado nos seus principais metabolitos o ácido salicílico (SA) e o ácido 2-hidroxi-4-trifluorometil benzoico (HTB).

O ASA, foi patenteada por Bayer em 1899, e tem sido usado por mais de 100 anos como medicação analgésica, anti-inflamatória e antipirética. O TRF (C₁₀H₇F₃O₄), é um derivado fluorado de salicilato com propriedades farmacológicas semelhantes aos do ASA.

A eficácia e a segurança do TRF foi demonstrada através de estudos clínicos realizados em pacientes com angina instável, enfarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, *by-pass* miocárdico, fibrilação arterial, substituição da válvula, e

pacientes asmáticos intolerantes a aspirina e/ou anti-inflamatórios não-esteróides. O TRF tem mostrado benefícios clínicos na prevenção secundária de eventos vasculares, quando comparado com o ASA [39-45].

Para apoiar os estudos farmacocinéticos, são necessários métodos analíticos adequados. A análise qualitativa e quantitativa para a determinação da ASA foi efectuada por vários métodos [46-55]. Estudos por espectrofotometria, HPLC e LC-MS-MS [45, 46, 56] foram descritos para a determinação dos protões ou ataque nucleófilico do TRF em solução, no plasma humana, ou em preparados farmacêuticos.

Estudos por espectrofotometria demonstraram que a hidrólise do ASA e do TRF é dependente do pH da solução e da temperatura, sendo muito rápida no intervalo de pH 11,0 - 12,0 e lenta no intervalo de pH 4,0 - 8,0. A estabilidade máxima destas moléculas é alcançada para valores de pH baixos [46].

1.2.3 Indóis

Os indóis representam uma classe de compostos aromáticos que se encontra predominantemente em produtos naturais tais como plantas, fungos e metabolitos [57].

O indol, **Figura 1.3**, é um composto orgânico heterocíclico com uma estrutura constituída por um anel de benzeno ligado a um pirrol.

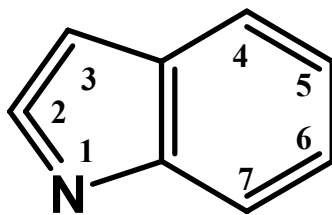


Figura 1.3 Estrutura química do indol.

Devido às propriedades do anel pirrólico, o indol sofre substituição eletrofílica, principalmente na posição C3 [21, 58-60]. Os indóis substituídos fazem parte da estrutura química dos neurotransmissores e das hormonas, nomeadamente serotonina e melatonina, sendo também precursores de outros compostos sintéticos. De facto, há centenas de derivados de indol, muitos dos quais se encontram na natureza, como por exemplo as triptaminas e as hormonas ergolinas e auxinas, e desempenham um papel fundamental em vários processos biológicos e em diagnósticos clínicos e microbiológicos [61, 62].

Os estudos farmacológicos revelaram que os compostos indólicos apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas importantes, tais como propriedades anti-inflamatórias [63, 64], analgésicas [64], antibacterianas [65], antifúngicas [66], neuroprotetoras [67, 68], antitumorais [69-71] e antioxidantes [72], aumentando o interesse no estudo destes compostos.

Os indóis podem sofrer oxidação electroquímica por vários mecanismos e os seus produtos de oxidação intermediários e finais dependem das condições em que ocorre a reacção. O comportamento electroquímico em solução aquosa de vários derivados de indol foi investigado utilizando diferentes tipos de eléctrodos: GCE [24, 73, 74], grafite pirolítica [75-78], pasta de carbono [79], ouro [24], platina [80], dióxido

de chumbo [81] ou BDDE [82]. Nos produtos de oxidação do ácido indol acético por HPLC, após a electrólise efectuada utilizando um eléctrodo de grafite pirolítica, foram identificados mais de 20 compostos diferentes [75, 76].

Os produtos de oxidação electroquímica dos ácidos indol acético e indol carboxílico foram também caracterizados em meio aquoso neutro, utilizando um eléctrodo de grafite pirolítica, revelando que as espécies formadas foram odioxindole e dímeros ligados C – C [24, 77]. A electro-oxidação do grupo benzeno da molécula do indol com a formação de espécies quinona foi também descrita na literatura [79, 83]. Em solventes não-aquosos a electrólise do indol e de derivados de indol pode levar a processos de polimerização [75, 84-86].

1.2.4 Berberina e sanguinarina

Entre os compostos naturais com potencial para actuar como agentes quimio-terapêuticos, os alcalóides ocupam uma posição importante devido às suas actividades bioquímicas: anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante e imunoestimulatória [87-102]. Entre os alcalóides destacam-se a berberina e a sanguinarina.

1.2.4.1 Berberina

A berberina tem sido utilizada desde tempos remotos, especialmente na medicina chinesa como uma droga antibacteriana, antifúngica e antiparasitária [103]. Actualmente, o principal uso clínico da berberina é no desenvolvimento de fármacos com acção antibacteriana, para o tratamento de parasitas intestinais e de infecções oculares [103, 104].

A berberina, **Figura 1.4**, é um alcalóide isolado inicialmente dos membros da família *Ranunculaceae*, mas que também ocorre em muitas outras plantas incluindo as espécies *Berberineeris* (*Berberidaceae*) e *Arcungelisia* (*Menispermaceae*) [104].

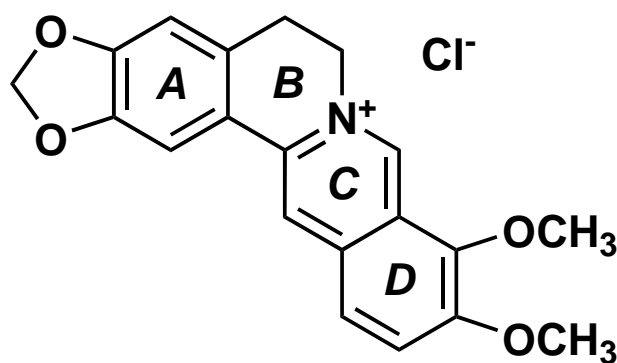


Figura 1.4 Estrutura química do cloreto de berberina.

A berberina apresenta também propriedades anticancerígenas, e os seus efeitos foram testados em tumores malignos cerebrais, em cancros do esófago, em leucemias e em linhas celulares de cancro de cólon, sendo observada a apoptose das células cancerosas [105-109]. Embora a maioria dos estudos tenham demonstrado que a berberina se liga ao DNA induzindo a sua fragmentação [110], o seu modo de acção ainda está bem esclarecido e espécies reactivas de oxigénio produzidas pela berberina desempenham um papel importante no mecanismo de formação de danos oxidativos no DNA [111], o que podem levar à morte celular.

Outros estudos demonstraram que a berberina está envolvida na inibição de biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos [112, 113], através da supressão das funções biológicas de várias enzimas e proteínas, incluindo Na^+ , K^+ -ATPase [114], p53 [115], protein kinase C [116]. Também, foi demonstrado que a berberina é acumulada

selectivamente nas mitocôndrias das células de melanoma de rato [117, 118], o que leva à inibição da translocação dos nucleotídeos da adenina [119], ao *stress oxidativo* [118], à inibição da progressão do ciclo celular [117] e ao dano mitocondrial em geral [118].

Relativo à importância da berberina nos processos biológicos, este composto foi o alvo de vários estudos, a maioria sendo direcionada para a sua determinação analítica na urina, no sangue e em diferentes tecidos animais e humanos, usando técnicas de quimio-luminescência, fluorimetria, eletroforese capilar e cromatografia [120-124].

Embora as propriedades electroquímicas da berberina sejam conhecidas, os estudos estão relacionados principalmente com os mecanismos de redução electroquímica e a adsorção em eléctrodos de mercúrio [125, 126], enquanto que a oxidação electroquímica da berberina num GCE foi apenas investigada em sistemas apróticos [127].

1.2.4.2 Sanguinarina

A sanguinarina, **Figura 1.5**, um alcalóide sintetizado por plantas das famílias *Papaveraceae*, *Fumariaceae* e *Rutaceae* [128], é conhecida pelas suas propriedades antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, antifúngica e imunoestimulante [87-90].

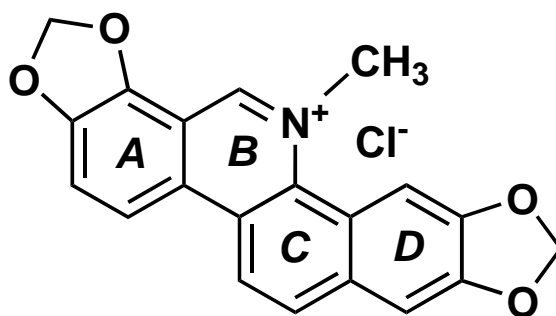


Figura 1.5 Estrutura química do cloreto de sanguinarina.

A sanguinarina actua contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos [129-131]. Em farmacologia, o cloreto de sanguinarina é usado principalmente em produtos de higiene bucal devido à diminuição da inflamação gengival e da formação da placa bacteriana [132].

Outros estudos revelaram propriedades anticancerígenas da sanguinarina, demonstrando que actua contra o cancro de pele favorecendo a expressão das proteínas envolvidas na morte celular induzida por radiação UV [133].

A sanguinarina também mostrou uma importante acção terapêutica, induzindo efeitos citotóxicos e apoptose em várias culturas celulares de cancro de próstata, pele, cervical e linfoma [129, 134-136], mas o mecanismo através do qual a sanguinarina inicia a morte das células não está completamente elucidado [137, 138] tendo sido observadas várias modificações na actividade das proteínas envolvidas na sinalização celular [90, 91, 129, 139, 140], bem como a formação de espécies reactivas de oxigénio [136] e danos no DNA [138, 141-145].

Devido à importância da sanguinarina como um potencial agente quimio-terapêutico, foram desenvolvidos diferentes procedimentos de análise baseados em técnicas de HPLC, electroforese capilar, espectrometria de UV, relaxação dieléctrica e calorimetria, que envolveram tanto a determinação quantitativa da sanguinarina, como a investigação dos seus efeitos sobre estruturas biológicas específicas, tais como DNA e proteínas [146-149]. Embora o processo de redução de vários compostos alcalóides tem sido estudado em eléctrodos de mercúrio [150, 151], os mecanismos de oxidação-redução da sanguinarina não foram ainda esclarecidos.

1.3 AMINOÁCIDOS

Um dos objectivos deste trabalho foi estudar as propriedades electroquímicas de proteínas sendo portanto necessário começar pela investigação das propriedades redox de aminoácidos que entram na sua constituição.

1.3.1 Estrutura dos aminoácidos. Propriedades físico-químicas

Os aminoácidos apresentam uma estrutura geral que consiste num grupo amino, um grupo carboxílico e um grupo variável R, ligados a um átomo de carbono saturado ($C\alpha$), **Figura 1.6**.

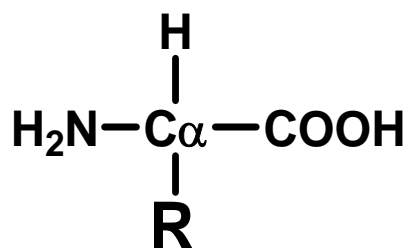
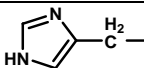
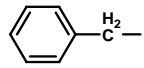
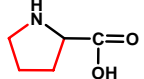
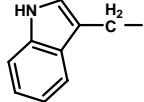
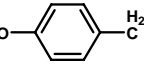


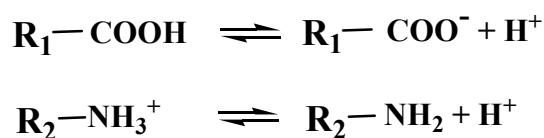
Figura 1.6 Estrutura dos aminoácidos.

Todos os aminoácidos contêm carbono, hidrogénio, azoto e oxigénio, além de dois aminoácidos que também contêm enxofre [152]. A especificidade de cada aminoácido é dada pela dimensão e pelas características variáveis na cadeia lateral R, **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1 Estrutura química e propriedades dos aminoácidos.

Aminoácido	Abreviatura	Cadeia lateral	Polaridade da cadeia lateral	Carga da cadeia lateral (a pH 7,00)	Índice de hidropaticidade [153]
Alanina	Ala (A)	$\text{H}_3\text{C}-$	apolar	neutra	1,8
Arginina	Arg (R)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	positiva	-4,5
Asparagina	Asn (N)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	neutra	-3,5
Ácido aspártico	Asp (D)	$\text{HO}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	negativa	-3,5
Cisteína	Cys (C)	$\text{HS}-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	neutra	2,5
Acido glutâmico	Glu (E)	$\text{HO}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	negativa	-3,5
Glutamina	Gln (Q)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	neutra	-3,5
Glicina	Gly (G)	$\text{H}-$	apolar	neutra	-0,4
Histidina	His (H)		polar	neutra	-3,2
Isoleucina	Ile (I)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{CH}(\text{CH}_3)-$	apolar	neutra	4,5
Leucina	Leu (L)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	neutra	3,8
Lisina	Lys (K)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	positiva	-3,9
Metionina	Met (M)	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	neutra	1,9
Fenilalanina	Phe (F)		apolar	neutra	2,8
Prolina	Pro (P)		apolar	neutra	-1,6
Serina	Ser (S)	$\text{HO}-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	neutra	-0,8
Treonina	Thr (T)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-$	polar	neutra	-0,7
Triptofano	Trp (W)		apolar	neutra	-0,9
Tirosina	Tyr (Y)		polar	neutra	-1,3
Valina	Val (V)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$	apolar	neutra	4,2

Em solução, os aminoácidos comportam-se como ácidos ou bases fracas, devido ao carácter ácido do grupo -COOH e básico do grupo -NH₂. Na gama de pH de 1 a 14, estes grupos apresentam uma série de equilíbrios, envolvendo a ligação e a dissociação de um protão:



Esta dissociação determina as características de ácidos fracos ou de bases fracas, respectivamente. O comportamento ácido-base dos aminoácidos é importante, pois a sua reactividade influencia as propriedades das proteínas [154].

Como o estado de ionização varia com o pH, em meio ácido, pH = 1, o grupo carboxilo está neutro (-COOH) e o grupo amino está ionizado (-NH₃⁺), enquanto que em solução básica, pH = 11, o grupo carboxilo está ionizado (-COO⁻) e o grupo amino está neutro (-NH₂) [155], **Figura 1.7**. Em pH neutro, os aminoácidos existem na forma de iões dipolares, ou *zwitterions*, com o grupo amino protonado (-NH₃⁺) e o grupo carboxilo na forma dissociada (-COO⁻), **Figura 1.7**.

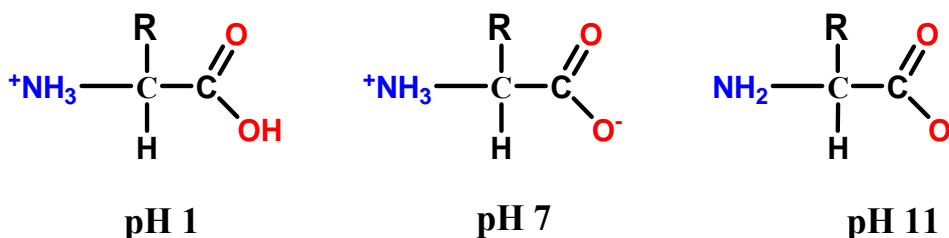


Figura 1.7 Estado de ionização dum aminoácido em função do valor de pH.

Do mesmo modo, a cadeia lateral **R** pode conter grupos funcionais com carácter doador ou aceitador de prótons, o que, no caso de alguns aminoácidos como a arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, histidina, lisina, tirosina, envolve um valor de pK_a adicional [20, 152, 154, 155], **Tabela 1.2**.

Tabela 1.2 Valores de pK_a dos aminoácidos.

Aminoácido	-COOH	-NH ₂	-R
Alanina	2,4	9,9	-
Arginina	1,8	9,0	12,5
Asparagina	2,1	8,7	-
Ácido aspártico	2,0	9,9	3,9
Cisteína	1,9	10,7	8,4
Ácido glutâmico	2,1	9,5	4,1
Glutamina	2,2	9,1	-
Glicina	2,4	9,8	-
Histidina	1,8	9,3	6,0
Isoleucina	2,3	9,8	-
Leucina	2,3	9,7	-
Lisina	2,2	9,1	10,5
Metionina	2,1	9,3	-
Fenilalanina	2,2	9,3	-
Prolina	2,0	10,6	-
Serina	2,2	9,2	-
Treonina	2,1	9,1	-
Tirosina	2,2	9,2	10,5
Triptofano	2,5	9,4	-
Valina	2,3	9,7	-

Os aminoácidos estão divididos em três categorias, em função das características químicas da cadeia lateral. A primeira categoria é constituída pelos aminoácidos com resíduos hidrofóbicos, Ala, Val, Leu, Phe, Ile, Pro e Met, a segunda é constituída pelos quatro aminoácidos com resíduos carregados, Asp, Glu, Lys e Arg, e a terceira inclui os aminoácidos com resíduos polares, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, His, Tyr e Trp [152, 155].

Todos os aminoácidos, excepto a glicina são moléculas quirais, que podem existir em duas formas diferentes, L- ou D-. Os sistemas biológicos dependem do reconhecimento específico de moléculas capazes de distinguir entre formas quirais. Na síntese das proteínas é reconhecida apenas uma das formas quirais dos aminoácidos, a forma L- [155, 156], no entanto não existe nenhuma razão óbvia pela qual a forma L- foi a forma preferida durante a evolução e não a forma D-.

1.3.2 Propriedades electroquímicas dos aminoácidos

Dos 20 aminoácidos possíveis constituintes das proteínas, apenas a tirosina [24, 27, 157], o triptofano [24, 27], a histidina [24, 158], a cisteína e a metionina [25, 159-164] são oxidáveis na superfície dos eléctrodos de carbono [24, 25, 27, 165-167]. As moléculas tirosina e triptofano apresentam nas suas estruturas os grupos fenol e indol que podem ser oxidados electroquimicamente.

Os estudos electroquímicos da tirosina [24, 167], mostraram que, para concentrações muito elevadas, o processo de oxidação conduz à formação dum filme polimérico inibidor, enquanto que, para concentrações baixas, a oxidação ocorre sem polimerização. No caso do triptofano, a sua oxidação pode ocorrer na posição C2 com a formação de 2-oxindolalanine [24].

A histidina, a cisteína e a metionina, podem ser oxidadas electroquimicamente devido às propriedades electrónicas das suas cadeias laterais [24, 25, 158-164]. Os centros electroactivos são no caso da histidina o grupo imidazol, da cisteína o grupo tiol enquanto que a metionina apresenta um átomo de enxofre que é oxidado.

Embora existam vários estudos relacionados com a oxidação electroquímica dos aminoácidos, os seus mecanismos de oxidação ainda não foram completamente esclarecidos. Por esta razão, um dos objectivos deste trabalho consiste na investigação do comportamento electroquímico dos aminoácidos electroactivos e na determinação dos seus mecanismos de oxidação.

1.4 PROTEÍNAS

As proteínas são componentes celulares muito importantes, sendo as moléculas biológicas que apresentam a maior variedade de formas e funções. As proteínas desempenham funções tanto estruturais como dinâmicas, destacando-se as propriedades enzimáticas ou catalisadoras de reacções bioquímicas, de sinalização e de transdução de sinais celulares e as funções de transporte de oxigénio no sangue [155]. As proteínas estão também envolvidas no material cromossómico, onde controlam o empacotamento do DNA e as suas funções. A forma, a regulação e a reprodução dos organismos são dominadas pelas proteínas. Uma outra função dinâmica das proteínas está directamente relacionada com a defesa do organismo, que é efectuada por tipos específicos de proteínas, as imunoglobulinas (anticorpos) e o interferon, que actuam no combate das infecções bacterianas e virais. [154, 155].

Devido à sua grande importância em todos os processos biológicos básicos da célula, as proteínas são os compostos biológicos mais estudados. O reconhecimento das várias funções das proteínas nos sistemas biológicos aumentou na última década, através da grande quantidade de informação gerada pelo projecto de Mapeamento de Genoma Humano (*Human Genome Mapping*) [168]. No âmbito deste projecto foi

observado que os cromossomas humanos contêm cerca de 25000-28000 genes [168], o que levou a uma estimativa de cerca de 25000 polipeptídeos numa célula humana. Ainda mais, variações na estrutura genética podem aumentar o número de novas proteínas [169].

De milhares de polipeptídeos, apenas é conhecida a estrutura de um pequeno número. Uma análise da Base de Dados das Proteínas (*Protein Data Base*) sugere que, até a data presente, foram determinadas cerca de 1400 estruturas distintas de proteínas [170]. Muitas proteínas estão contidas nas membranas celulares [155], o que dificulta a investigação das suas características estruturais e funcionais.

Uma vez que as proteínas podem apresentar múltiplas funções, a sua classificação não está padronizada. Embora as proteínas sejam constituídas por 20 aminoácidos, elas podem apresentar uma enorme diversidade, determinada pela ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica [171, 172]. Algumas proteínas podem conter maior abundância um dos aminoácidos, enquanto que outras podem nem conter alguns dos aminoácidos, o que leva a variações na complexidade, no tamanho, no peso molecular e no número de subunidades (cadeias polipeptídicas).

As propriedades físico-químicas das proteínas, tais como a carga, a hidrofobicidade e a polaridade, influenciam muitos dos seus aspectos estruturais e funcionais [155]. Estas propriedades são determinadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes, estando envolvidas nas interações não-covalentes, como por exemplo as ligações de hidrogénio, as forças hidrofóbicas e as interações electrostáticas, e contribuem para uma maior estabilidade da proteína no seu estado natural [154, 155].

As proteínas interagem por ligações covalentes e não-covalentes com outras biomoléculas, tais como lípidos, (lipoproteínas), carboidratos(glicoproteínas), ácidos nucleicos, grupos fosfato, flavinas, grupos prostéticos, e iões metálicos etc. [155, 173].

1.4.1 Estrutura das proteínas

Os aminoácidos formam ligações peptídicas através de uma reacção de condensação com a eliminação de uma molécula de água, num processo que normalmente ocorre nos ribossomas. A formação de uma ligação peptídica covalente leva à ligação de dois aminoácidos, formando um dipéptido [155], **Figura 1.8**.

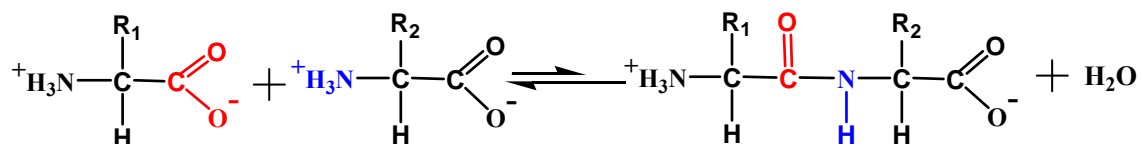


Figura 1.8 Formação de uma ligação peptídica covalente num dipéptido.

Essas ligações possuem características híbridas, partilhando propriedades mistas, tanto das ligações simples C-N, como das ligações duplas C=N. Por esta razão, a ligação peptídica apresenta um menor comprimento quando comparado com uma ligação covalente, o que leva à limitação da sua rotação e à orientação preferencial dos átomos na configuração *trans* [152]. Uma excepção a essa regra é a ligação peptídica

dos resíduos da prolina, na qual a configuração *cis* aumenta a estabilidade em relação à configuração *trans* [152, 155].

As proteínas são moléculas complexas exibindo uma hierarquia de níveis de organização estrutural. A sequência dos aminoácidos na cadeia polimérica representa a **estrutura primária** da proteína e é determinada geneticamente pela expressão da informação codificada na sequência de nucleotídios de um gene do DNA. As cadeias polipeptídicas típicas contêm cerca de 100 a 600 moléculas de aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 15.000 - 70.000 Da [155].

No entanto, a sequência de aminoácidos da proteína e a sua estrutura primária fornecem pouca informação sobre as suas funções. A cadeia polipeptídica é flexível e as ligações químicas entre os átomos de um determinado aminoácido *i* na cadeia, **Figura 1.9**, definem 3 eixos de rotação (σ , ψ , ϕ) sobre os quais a proteína pode rodar alcançando diferentes configurações espaciais [152].

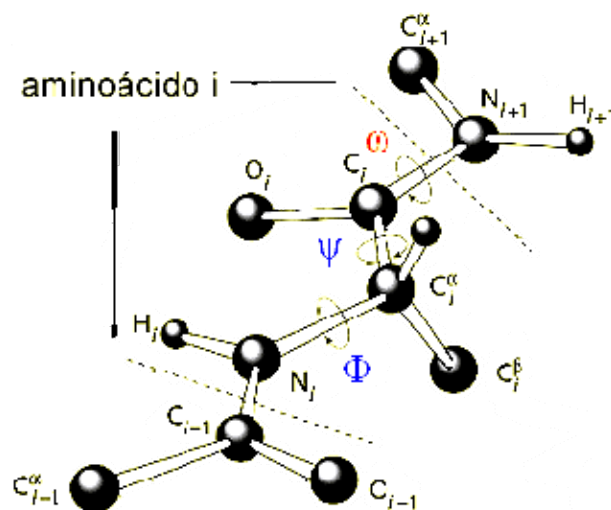


Figura 1.9 As ligações químicas entre os átomos de um determinado aminoácido *i*.
Os eixos de rotação (σ , ψ , ϕ).

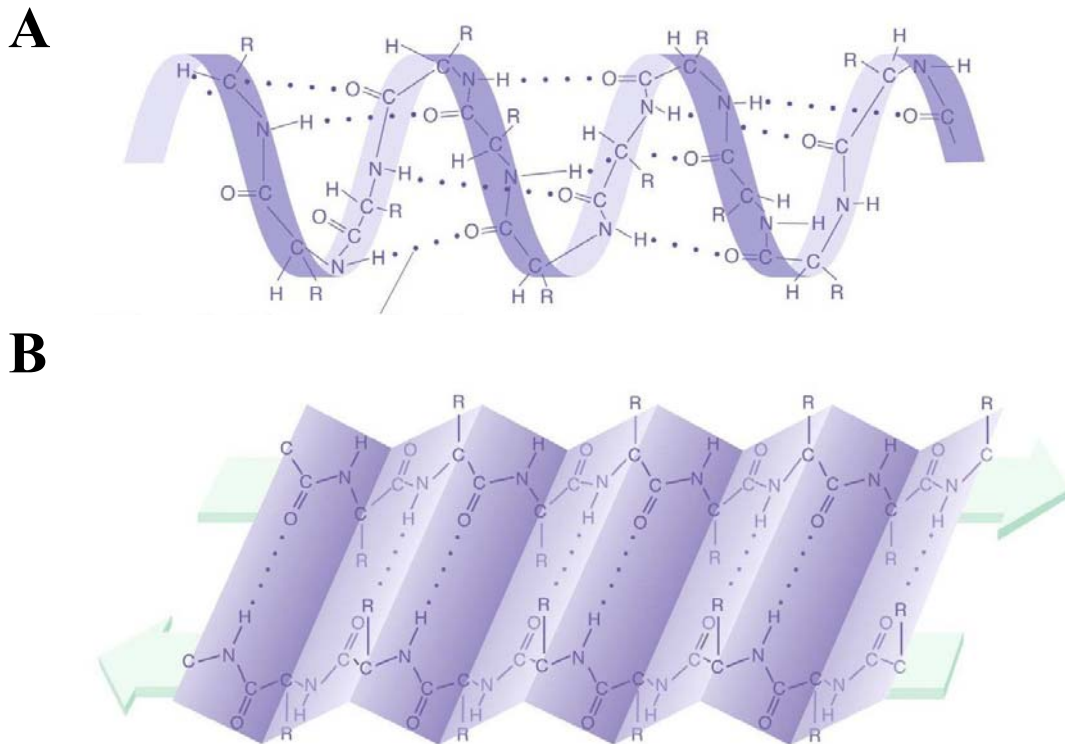


Figura 1.10 Estruturas secundárias das proteínas: (A) α -hélice e (B) folha β .

Devido a esta flexibilidade, em meio polar, as sequências de aminoácidos podem formar ligações de hidrogénio entre os grupos $-NH$ e $C=O$ da cadeia principal dando origem à **estrutura secundária** da proteína [155]. Existem essencialmente dois tipos de estruturas secundárias originadas pelas rotações em torno das ligações adjacentes à ligação péptidica, a **α -hélice**, quando a rotação se dá no mesmo sentido, e a **folha- β** , quando a rotação se dá em sentidos apostos, **Figura 1.10**.

Para realizar a sua função, as proteínas assumem uma forma particular activa, através do processo de dobragem, que é geralmente desfavorecida pela entropia, pois envolve a transição de um grande número de cadeias laterais com diferentes propriedades para uma única estrutura ordenada. Ao dobrar as proteínas superam a entropia conformacional da sua estrutura através de interações electrostáticas entre os

grupos carregados, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e interacções de Van der Waals que se estabelecem entre os seus aminoácidos [155]. A maior estabilidade termodinâmica advém das interações hidrofóbicas dos aminoácidos, ficando as cadeias laterais hidrofóbicas empacotadas no interior da molécula [155].

Todas as interacções, hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e interacções de Van der Waals estabelecidas entre os aminoácidos constituintes da proteína e a água levam à coalescência e ao empacotamento da proteína no que geralmente se chama a **estrutura terciária** da proteína. O arranjo tridimensional (ou conformação) dos átomos da proteína na estrutura terciária é de extrema importância porque geralmente coincide com a estrutura nativa, a estrutura que confere à proteína uma função biológica específica. [152, 155].

A **estrutura quaternária** da proteína, que é o nível de organização mais elevado, é dada pela associação não covalente de várias unidades independentes de estrutura terciária. Conhecer a estrutura tridimensional das proteínas é fundamental para compreensão de sua função [155].

1.4.2 Oxidação das proteínas *in vivo*

A oxidação das proteínas ocorre através da exposição a espécies oxidativas, como os intermediários reactivos de oxigénio ou nitrogénio causados por reacções metabólicas no interior das células, a partir dos subprodutos de reacções de *stress oxidativo* [174], ou através da presença de compostos oxidantes fortes. Todos estes factores podem levar à formação de danos selectivos ou de modificações estruturais das proteínas [174, 175].

1.4.2.1 Radicais livres

Os radicais livres são compostos químicos com electrões desemparelhados nas orbitais moleculares não ligantes. Devido a esta característica, são muito reactivos e estão envolvidos em processos celulares responsáveis por danos oxidativos nas células, que levam a alterações estruturais e funcionais das biomoléculas numa reacção em cadeia [15].

In vivo os radicais livres mais comuns são as espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidróxilo ($\bullet OH$), bem como algumas espécies reactivas de nitrogénio (RNS), tais como o radical óxido nítrico, (NO^{\bullet}) e o radical dióxido nítrico, (NO_2^{\bullet}) [15].

Nas células ROS e RNS podem ser gerados por via endógena, como consequência directa do metabolismo aeróbico, ou por via exógena, devido à exposição à radiação UV, radiação ionizante, fumo de exaustão e substâncias capazes de gerar estas espécies reactivas, como os agentes carcinogénicos [176].

Os mecanismos de formação de ROS e RNS ocorrem essencialmente por [15]:

- 1) reacções de transferência de electrão que envolvem processos de adição sucessiva de electrões ao oxigénio molecular, formando intermediários reduzidos ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 , NO^{\bullet} , $ONOO^-$);
- 2) reacções de transferência de energia que envolvem a excitação do oxigénio tripleto no estado fundamental ao estado singlete (1O_2).

As espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio incluem não só radicais livres, mas também outras espécies oxidantes com carácter não radical, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o anião peroxinitrito, ($ONOO^-$), que participam em reacções de formação de radicais livres [15].

Alguns outros exemplos de agentes químicos que podem modificar oxidativamente as proteínas incluem compostos de peróxido, como perborato e peroxicarbonato, periodato, (IO_4^-), sais metálicos na presença de espécies de oxigénio, como os sais de ferro (Fe^{3+} e Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), ozónio (O_3), ácido hipobromoso (HOBr); ácido hipocloroso (HOCl), ácido perfórmico (HC(O)OOH) e o radical de triclorometilperóxido (CClOO^*) [15]. Em condições especiais, as porfirinas, bem como radiações gamma e UV, podem também alterar a estrutura das proteínas [174, 177].

1.4.2.2 Interacção entre as proteínas e os radicais livres

As proteínas são alvos primários da oxidação *in vivo* devido à sua abundância em células, quando comparadas com outras moléculas biológicas. Os danos nas proteínas através da oxidação induzida pelos radicais livres são conhecidos por causar vários tipos de cancro, doenças neurológicas degenerativas, pulmonares, inflamação, doenças cardiovasculares e uma série de outros problemas [174, 175, 178-181]. A oxidação das proteínas pode alterar a sua actividade, inibir a interacção entre as proteínas e outros compostos, modificar as cadeias laterais dos aminoácidos, quebrar as ligações peptídicas, e até mesmo causar a formação de ligações entre proteínas [174, 175, 178, 182, 183]. Após a oxidação, a estrutura da proteína é modificada, o que compromete a sua actividade.

A oxidação das proteínas ocorre principalmente ao nível das cadeias laterais de aminoácidos. Nas mesmo se apenas uma cadeia lateral dum resíduo de aminoácido é oxidada, toda a estrutura da proteína é modificada, o que provoca a desregulação da sua actividade *in vivo*.

Os resíduos de triptofano são facilmente oxidados a formilquinurenina, quinurenina e vários derivados hidroxilados. A fenilalanina pode ser oxidada, levando à formação de tirosina e de outros derivados hidroxilados, e os resíduos da histidina são oxidados a 2-oxohistidina e outros derivados [174]. A oxidação dos resíduos de lisina, arginina, prolina, e treonina pode levar à formação de derivados carbonílicos [174, 184]. A presença destes grupos em proteínas tem sido utilizada como um marcador da oxidação das proteínas mediada por ROS e RNS, sendo associada a várias doenças.

Embora todos os resíduos de aminoácidos possam ser biologicamente oxidados, os aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina, são os mais facilmente oxidados por espécies ROS e RNS [185] devido ao enxofre, que tem um baixo potencial formal de oxidação [186]. Em condições fisiológicas e na presença de oxidantes fracos, os resíduos de cisteína são biologicamente oxidados a dissulfetos, **Figura 1.11A**, e os resíduos de metionina a metionina sulfóxido (MetO), **Figura 1.11B**, sendo do ponto de vista fisiológico os fenômenos oxidativos mais relevantes nas proteínas [175, 178, 187, 188].

A oxidação *in vivo* da cisteína e da metionina está muito bem descrita e tem sido demonstrado que estas reações podem ser fisiologicamente reversíveis [180, 189]. A maioria dos sistemas biológicos contém sistemas de reparação dos danos oxidativos e os redutores de dissulfeto e sulfóxido podem converter as formas oxidadas dos resíduos de cisteína e metionina nas suas formas inalteradas. Estas são as únicas modificações oxidativas das proteínas que podem ser reparadas [177, 180, 182, 190].

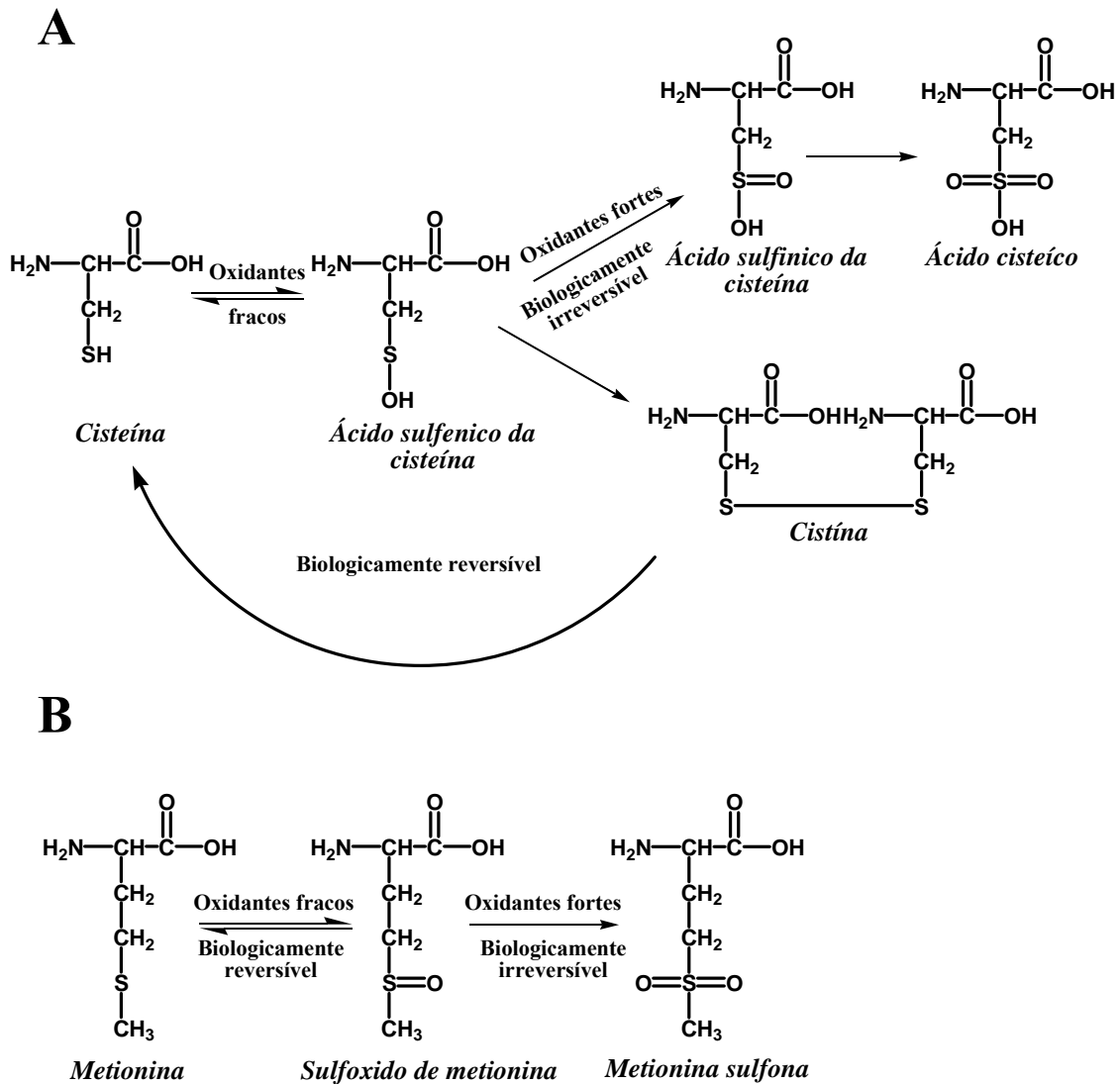


Figura 1.11 Oxidação biológica da cisteína e da metionina.

Apesar de normalmente os resíduos de metionina não estarem na superfície da proteína, algumas proteínas podem conter resíduos de metionina expostos [191, 192]. A oxidação e a redução dos resíduos de metionina têm consequências profundas para as suas funções representando um dos mecanismos de regulação das proteínas [192].

1.4.2.3 Metionina sulfóxido reductase A

Nos vários mecanismos de reparação dos danos oxidativos causados pelos radicais livres em proteínas, destaca-se a enzima metionina sulfóxido reductase (MsrA), **Figura 1.12**, cuja função é a redução da metionina oxidada (MetO) a metionina (Met), tendo sido relatado que a MsrA reduz preferencialmente a forma levogira da MetO [178, 187, 189, 193, 194].

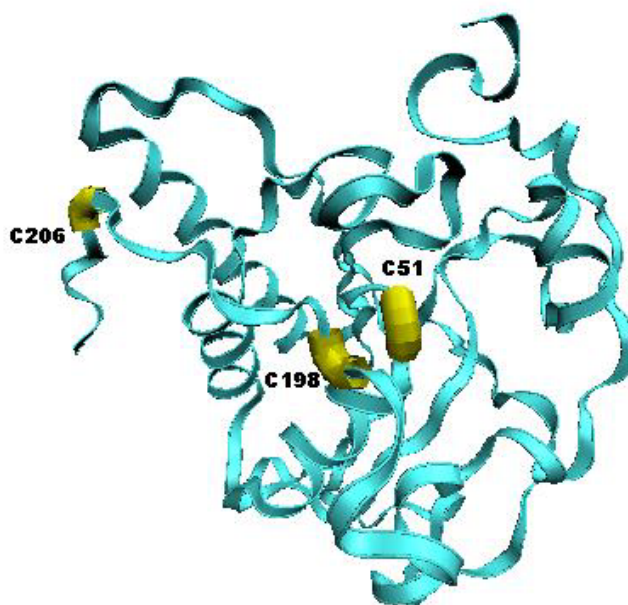


Figura 1.12 Estrutura tridimensional da metionina sulfóxido reductase A (MsrA).

A MsrA é uma enzima relativamente pequena encontrada numa variedade de organismos, tais como bactérias [195], plantas [196], mamíferos [197], e em organismos humanos [191]. A sequência dos aminoácidos da MsrA é bem conservada para as diferentes espécies [189, 191, 193, 194].

Os estudos de cristalografia da estrutura da MsrA mostraram a existência de três resíduos de cisteína, C51, C198 e C206, que formam o centro catalítico da enzima [193, 198].

O mecanismo de acção da MsrA envolve a redução da MetO formada na sequência de aminoácidos duma determinada proteína após o ataque oxidativo, para a sua forma inicial Met. Este processo é iniciado pelo ataque nucleofílico da C51 da MsrA sobre a MetO da proteína oxidada, conduzindo à formação dum produto intermediário instável cuja degradação leva à formação da Met, e à hidroxilação de C51 da MsrA com a formação do ácido cisteico. Em seguida, várias modificações conformacionais da enzima envolvem a formação duma ligação dissulfeto entre C198 e C206. Por sua vez, esta ligação é também reduzida através de um outro sistema enzimático de modo que a MsrA volta à forma activa inicial [193]. Este mecanismo, conduz à hipótese que os resíduos de metionina funcionam como um sistema de defesa antioxidante das proteínas [189, 191, 192].

1.4.3 Propriedades electroquímicas das proteínas

Nos últimos anos, a investigação das proteínas através de métodos electroquímicos tem atraído um interesse crescente, uma vez que o estudo da transferência de electrão entre as proteínas e os eléctrodos pode servir como modelo para o estudo dos mecanismos de troca de electrões das proteínas nos sistemas biológicos [173, 199-207]. Deste modo, é possível estabelecer uma base para o desenvolvimento de novos tipos de biossensores [200, 208, 209], reactores catalíticos [206, 207, 210, 211] e dispositivos biomédicos [212, 213].

Contudo, quando as proteínas interagem com a superfície do eléctrodo ocorre a sua adsorção. Este processo dificulta o estudo electroquímico das proteínas e das enzimas devido ao bloqueamento da superfície do eléctrodo e à ocorrência de modificações estruturais nas proteínas, ou mesmo a sua degradação. Adicionalmente, a orientação desfavorável da proteína na superfície do eléctrodo reduz a acessibilidade dos seus centros electroactivos protegidos no interior das cadeias polipeptídicas [214-219]. De facto, a distância entre o centro electroactivo da proteína e o eléctrodo pode variar em função da orientação e/ou da conformação da proteína, e o aumento desta distância dificulta a oxidação electroquímica da proteína [220].

Para ultrapassar estes inconvenientes vários estudos electroquímicos de proteínas utilizam mediadores químicos que facilitam a transferência de electrões e minimizam os efeitos de atracção e repulsão entre a molécula biológica e o eléctrodo [221]. Os mediadores são pequenas moléculas electroactivas que pode alternar entre os estados oxidado e reduzido facilitando a transferência de electrões entre o centro reactivo de uma proteína e uma superfície do eléctrodo [222]. Contudo, apesar da utilização de mediadores na investigação de transferência de electrões entre uma proteína e o eléctrodo poder diminuir e minimizar as dificuldades causadas pela adsorção, pode também complicar os processos do eléctrodo [206, 223].

A investigação electroquímica directa das proteínas, sem o recurso a mediadores, representa um grande desafio, e abre caminho para estudos mais aprofundados não só de termodinâmica, como também de cinética das reacções [206]. Um dos objectivos deste trabalho está relacionado com a investigação do comportamento redox de proteínas directamente na superfície dos eléctrodos de carbono, especificamente e MsrA.

Para desenvolver procedimentos electroquímicos sem o uso de mediadores é necessário escolher cuidadosamente o eléctrodo de trabalho, de modo a permitir a imobilização directa da proteína na sua superfície, para controlar as interacções entre a proteína e o eléctrodo e facilitar a transferência de electrões. Quando a proteína é imobilizada na superfície do eléctrodo, a difusão é eliminada e podem ser obtidos os parâmetros termodinâmicos e cinéticos. Este procedimento foi aplicado por F. Armstrong nos anos 80 [204], para proteínas redox pequenas, e desde o início de 1990 para enzimas redox grandes [206, 224]. Nos últimos anos, esta técnica foi bastante utilizada nos estudos electroquímicos de várias proteínas redox sendo determinados vários aspectos, como a transferência de protões e electrões inter- e intra-molecular e a detecção de oxigénio em hidrogenases [225].

Contudo, a orientação de uma proteína na superfície do eléctrodo é influenciada pelo pH da solução, que controla o número e a natureza das cargas presentes na superfície da proteína e do eléctrodo, pela força iónica, a composição do electrólito e o potencial aplicado [206, 214, 219].

Na literatura destaca-se uma vasta gama de estudos sobre o comportamento electroquímico das proteínas. Contudo, a maioria envolve a investigação de proteínas que contém cofactores redox, como hemoglobina, azurina, citocromo *c* e glucose oxidase [208, 210, 216, 226-231], embora este tipo de proteínas seja minoritário num organismo. Por outro lado, sabe-se que os aminoácidos tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina são oxidáveis electroquimicamente. Baseado nas suas propriedades redox, vários estudos sobre a electroquímica de diferentes proteínas foram realizados. Na **Tabela 1.3** são apresentadas algumas das proteínas estudadas em eléctrodos de carbono: GCE, eléctrodo de pasta de carbono (*carbon paste electrode* -

CPE), eléctrodo de grafite pirolítica (*pyrolytic grafite electrode* - PGE), eléctrodo de fibra de carbono (*carbon fiber electrode* - CFE), através da detecção electroquímicas dos seus aminoácidos electroactivos.

Tabela 1.3 Proteínas e os seus grupos electroactivos estudados em eléctrodos de carbono.

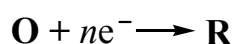
Proteína	Aminoácidos oxidáveis	Eléctrodo	Referência
Insulina	C, Y	GCE	[232, 233]
Albumina sérica bovina	Y, W	CPE	[166, 167]
RNAase	Y, W	CPE	[166, 167, 234]
Concalavalina A	Y, W	CPE	[167]
Amilina	Y, W	PGE	[235]
GnRH	Y, W	CFE	[236]
Vasopressina	Y	CFE	[237]
Angiotensina II	Y	CFE	[237]
Trombina	Y, W	GCE	[237]
Neuropéptido Y	Y	PGE	[234]
α - Lactoalbumina	C, M, Y, W	PGE	[234]
Lisossomas com S-S	Y, W	PGE	[166, 234]
Lisossomas sem S-S	Y, W	PGE	[234]
Apomioglobina	M, Y, W	PGE	[234]
Tripsinogénio	C, M, Y, W	PGE	[234]
Anidrase carbónica	M, Y, W	PGE	[234]
Albumina sérica humana	C, M, W, W	PGE	[234]

Deste modo, a investigação electroquímica de proteínas, baseada na detecção da resposta electroquímica dos resíduos de aminoácidos, representa uma nova alternativa, com diversas aplicações importantes na área dos biossensores, da biotecnologia, dos equipamentos médicos e sistemas de distribuição farmacológicos.

1.5 PRINCÍPIOS DA ELECTROQUÍMICA

A electroquímica estuda os fenómenos químicos associados à separação e a transferência de carga num determinado sistema. A transferência de carga pode ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície dum eléctrodo [238].

A maioria dos processos de transferência de carga envolvem a transferência de electrões e no caso das espécies oxidadas O, e reduzidas R a reacção redox é:



onde **O** recebe n electrões para se transformar em **R**. O par **O** | **R** tem associada uma energia redox, E_{redox} , está relacionada com o potencial de eléctrodo. Os electrões no eléctrodo (que é um condutor) têm uma energia máxima, que é distribuída à volta do nível Fermi, o nível electrónico ocupado mais elevado, E_F . Os electrões num eléctrodo de trabalho são sempre transferidos de e para o nível Fermi [238].

Para assegurar a electroneutralidade, ocorrem duas ou várias reacções de transferência de carga, em direcções opostas. Normalmente as reacções de transferência de carga estão separadas no espaço, ocorrendo em eléctrodos diferentes, imersos em solução numa célula electroquímica. Estes eléctrodos estão ligados por meios condutores, tanto na solução (através do *electrólito de suporte* – transporte iónico), como externamente (através de fios eléctricos) de tal modo que a carga pode ser transportada.

Em todos os processos electroquímicos, o *eléctrodo de trabalho* é o eléctrodo onde ocorre a reacção electroquímica. O potencial deste eléctrodo é controlado através do *eléctrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato.

O eléctrodo de referência utilizado numa experiência electroquímica deve possuir uma impedância elevada de forma por ele não passar corrente. A corrente da célula electroquímica flui entre o eléctrodo de trabalho e o *eléctrodo auxiliar* através da solução do electrólito de suporte.

Para uma redução, os electrões transferíveis a partir do eléctrodo devem ter um mínimo de energia antes da transferência poder ocorrer, o que corresponde a um potencial suficientemente negativo (em volts). Para uma oxidação existe uma energia máxima que o menor nível desocupado do eléctrodo pode ter, a fim de receber electrões a partir das espécies na solução, correspondente a um potencial suficientemente positivo (em volts) [238].

Na proximidade da superfície do eléctrodo (*camada de difusão*) as espécies são transportadas só através da difusão **Figura 1.13**, [238]. Neste processo, distinguem-se alguns parâmetros de grande importância:

- 1 - k_d – o coeficiente de transferência de massa que descreve o processo de difusão da solução, fora da camada de difusão, para proximidade da superfície do eléctrodo.
- 2 - k_a e k_c – as constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica, respectivamente as quais descrevem a cinética da reacção do eléctrodo. As constantes de transferência de carga estão descritas pelas fórmulas deButtler – Volmer:

$$k_a = k_0 \exp [\alpha_a n F (E - E^0) / RT]$$

$$k_c = k_0 \exp [-\alpha_c n F (E - E^0) / RT]$$

onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reacção electroquímica.

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

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

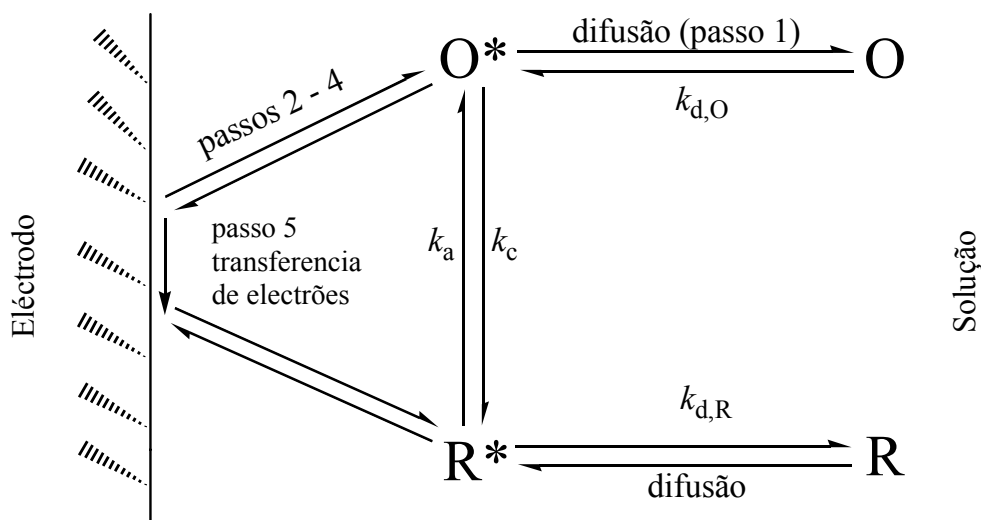


Figura 1.13 Esquema da transferência de electrão num eléctrodo: Passo 1 - difusão; Passo 2 - rearranjo da atmosfera iónica; Passo 3 – reorientação dos dipolos do solvente; Passo 4 – alterações nas distâncias entre o ião central e os ligandos; Passo 5 – Transferência do electrão [238].

A dupla camada electrolítica é a região interfacial onde ocorrem as reacções electroquímicas.

Considera-se, em todas as experiências electroquímicas, que durante a reacção de oxidação o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões transferidos e a corrente tem um valor positivo, a corrente anódica, I_a . Ao contrário, durante a reacção de redução o eléctrodo de trabalho funciona como dador de electrões e a corrente registrada tem um valor negativo, a corrente catódica, I_c [238].

1.5.1 Eléctrodos de carbono

Numa experiencia electroquímica as propriedades de eléctrodo de trabalho têm uma grande importância. A escolha do material de eléctrodo depende em grande parte da zona de potenciais úteis num solvente particular e das qualidades e pureza do material [238].

Em electroquímica, o carbono é um material muito usado para eléctrodos e está disponível numa variedade de microestruturas: carbono vítreo, fibras e nanotubos de carbono, carbono negro, várias formas de grafite e de pasta de carbono, e diamante. Alguns tipos de eléctrodos de carbono (por exemplo, carbono vítreo) têm sido estudados e utilizados extensivamente há mais de 30 anos [238]. Mesmo assim, ainda existem pontos menos esclarecidos sobre a relação entre a estrutura e o desempenho e como esta relação afecta a actividade electroquímica.

O carbono existe em duas estruturas cristalinas distintas: diamante e grafite. O cristal do diamante é cúbico e os átomos de carbono estão dispostos em uma configuração tetraédrica com as ligações híbridas sp^3 [239]. Esta ligação covalente forte

faz do diamante um material extremamente duro. A grafite consiste numa estrutura hexagonal com os átomos de carbono dispostos em uma configuração triangular com ligações híbridas sp^2 . Esse arranjo atómico leva à formação de camadas planas, ou folhas de grafeno, com um espaçamento entre os planos de 3,354 Å [238]. No entanto ainda existem variantes da microestrutura grafitica que caracterizam outros tipos de materiais de eléctrodo de carbono sp^2 . Por exemplo, quando a dimensão do plano das folhas de grafeno é pequena e o espaçamento entre elas é grande, esse carbono é classificado como amorfo (por exemplo carbono vítreo, etc.) [238].

1.5.1.1 Eléctrodo de carbono vítreo

O eléctrodo de carbono vítreo (GCE) é um dos mais utilizados em experiências electroquímicas. Está disponível em diversas arquitecturas, incluindo cilindros, discos e placas. Ao contrário da grafite pirolítica (PG - *pyrolytic graphite*), o GC é duro e microestruturalmente isotrópico [238]. A sua fabricação consiste na carbonização por aquecimento de polímeros fenol/formaldeído ou de poliacrilonitrilo entre 1000 e 3000 °C sob pressão. O tratamento térmico é aplicado lentamente ao longo de dias e provoca a expulsão dos átomos que não são de carbono. Isso produz uma microestrutura de carbonos conjugados [238].

O GC é impermeável a líquidos e gases, fácil de polir e compatível com todos os solventes comuns. Estas propriedades têm conduzido à sua utilização generalizada na electroquímica para determinar o mecanismo de reacção e na análise voltamétrica de vários compostos. A resistência do GC é suficientemente baixa para ser insignificante na maioria das aplicações electroquímicas. A estrutura de poros aleatórios impede a entrada do solvente, mas foi descrita a inserção pouco profunda de iões de electrólito

nos poros localizados na superfície do eléctrodo. A corrente basal do GC é geralmente superior á dos compósitos de grafite, uma vez que toda a sua superfície é activa [238].

1.5.1.2 Eléctrodo de diamante dopado com boro

Os eléctrodos de diamante dopados com boro (BDDE) têm sido utilizados desde 1983 [240]. O diamante é uma forma cristalina do carbono, muito dura, com cada átomo do carbono ligado a outros quatro átomos com hibridização sp^3 , formando uma estrutura tetraédrica [239]. No diamante natural ou sintético, o boro funciona como aceitador de electrões devido a uma deficiência de um electrão na camada de valência. Esta deficiência confere a propriedade de semiconductor do tipo p para o BDDE [241].

As propriedades electroquímicas mais importantes do BDDE são a janela larga de potencial, a sua estabilidade electroquímica tanto em soluções aquosas como em não aquosas, a adsorção negligenciável de moléculas orgânicas na sua superfície, a corrente de fundo voltamétrica baixa e estável e a baixa capacitância, o que permite alcançar limites de detecção baixos [242-251].

As propriedades do BDDE dependem de vários factores, como a concentração do dopante, os defeitos estruturais no filme de diamante, as impurezas do carbono sp^2 , a orientação cristalográfica e a composição da superfície (H, O) [250].

Apesar do BDDE ter um excelente desempenho na detecção electroquímica, pois as espécies electroquimicamente activas não são geralmente adsorvidas na sua superfície, o seu comportamento electroquímico está fortemente relacionado com a geração (por decomposição da água) de radicais hidróxilo [247, 252-254]. Por esta razão, é necessário efectuar uma caracterização pormenorizada da geração electroquímica de radicais hidróxilo na superfície de BDDE.

1.5.2 Métodos voltamétricos

A voltametria consiste na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação de um potencial ao eléctrodo origina uma corrente faradaica, I_f , que é directamente relacionada à transferência de carga, e uma corrente capacitiva, I_c , que é necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada [238]. A corrente total registada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

Em cada experiência voltamétrica o potencial aplicado, tal como a corrente medida, variam com o tempo. A curva de corrente em função do potencial, $I = f(E)$, que é registada no decorrer de um ensaio voltamétrico é designada por voltamograma. A variação do potencial com o tempo é designada por velocidade de varrimento, v . A corrente registada é proporcional a velocidade da reacção electroquímica que ocorre na região interfacial entre o eléctrodo e a solução e dá informações sobre o mecanismo de reacção electroquímica [238].

Dos métodos disponíveis para estudar os processos de eléctrodo, os métodos de varrimento de potencial são provavelmente os mais usados. No presente trabalho foram utilizadas três métodos voltamétricos: a voltametria cíclica (*cyclic voltammetry* – CV), a voltametria de impulso diferencial (*differential pulse* – DP), e a voltametria de onda quadrada (*square wave* – SW).

1.5.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a obtenção de informações qualitativas sobre as reacções electroquímicas. Esta técnica é muitas vezes a primeira

experiência realizada num estudo electroquímico, devido à sua capacidade de fornecer rapidamente informações sobre a cinética das reacções de transferência de electrões, sobre as reacções químicas acopladas e sobre os processos de adsorção. Em particular, a voltametria cíclica oferece uma rápida localização dos potenciais redox da espécie electroactiva, e permite uma avaliação imediata do efeito do meio sobre o processo redox [238].

Na voltametria cíclica o potencial aplicado ao eléctrodo varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante $v = dE/dt$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f) previamente escolhidos. Após o início do varrimento de potencial, quando se atinge o valor E_{max} o sentido do varrimento é invertido e é varrido até E_{min} . O sentido de varrimento de potencial pode ser positivo ou negativo, **Figura 1.14**.

Para uma reacção descrita pela equação $O + ne \rightleftharpoons R$, só com espécies O inicialmente presentes na solução, durante o varrimento são geradas electroquimicamente espécies R, quando o potencial aplicado se torna suficientemente “negativo”. Após a rápida inversão da direcção do varrimento para o sentido positivo, as espécies R são oxidadas para O, conforme indicado pela corrente anódica. Assim, a voltametria cíclica é capaz de gerar rapidamente uma nova espécie durante o varrimento e, em seguida, analisar a espécie gerada no varrimento em sentido contrario, um aspecto muito importante desta técnica [238].

Os parâmetros importantes na voltametria cíclica, que permitem a caracterização do processo de eléctrodo são: o potencial do pico anódico (E_{pa}), a corrente máxima que resulta da reacção de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa}), o potencial de pico catódico (E_{pc}) e a corrente máxima que resulta da reacção de redução ou pico de corrente catódica (I_{pc}) [238], **Figura 1.14B**.

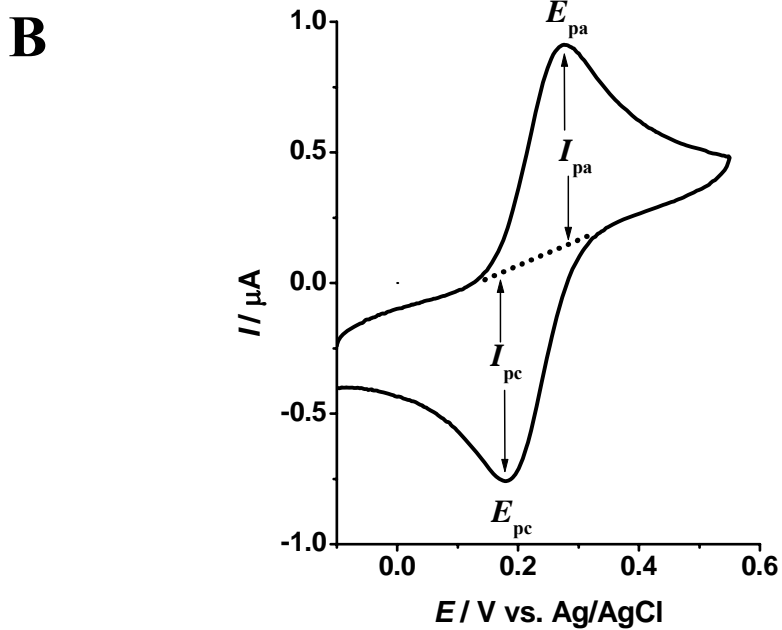
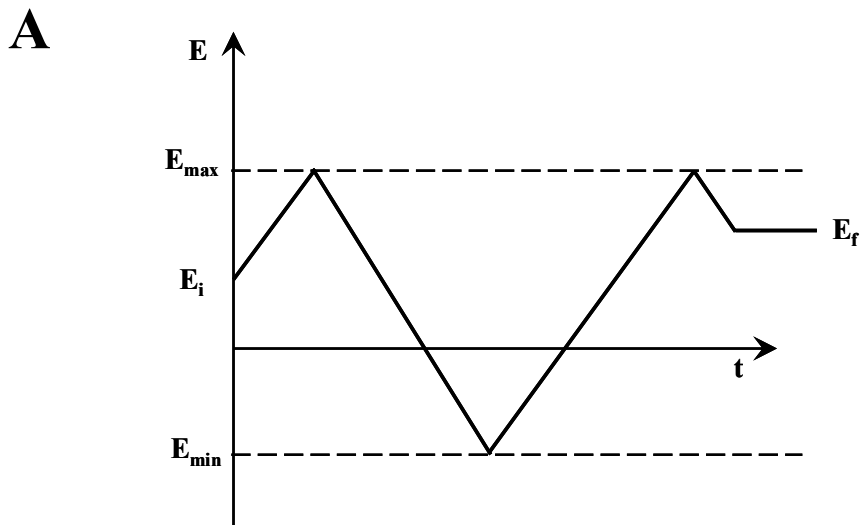


Figura 1.14 (A) Representação esquemática da aplicação de potencial com o tempo em voltametria cíclica; E_i – potencial inicial, E_f – potencial final, E_{\max} – potencial máximo, E_{\min} – potencial mínimo [238];
 (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível [238].

As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reacção de transferência de carga e com a concentração da espécie electroactiva.

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

Um par redox no qual ambas espécies trocam rapidamente electrões com o eléctrodo de trabalho é denominado como par electroquimicamente reversível. As condições necessárias para diagnosticar um sistema reversível através de voltametria cíclica são:

- $I_p \sim \nu^{1/2}$
- E_p independente de ν
- $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 57/n$ (mV)
- $|E_p - E_{p/2}| = 56,6/n$ (mV)
- $|I_{pa}/I_{pc}| = 1$

Se as condições acima mencionadas não são verificadas, o sistema pode ser considerado como quasi-reversível ou irreversível. A irreversibilidade electroquímica é causada pela lentidão na troca de electrões das espécies redox com o eléctrodo de trabalho.

A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, o valor da razão I_{pa}/I_{pc} tornando-se diferente de 1 e a separação entre os picos aumentando.

Para um sistema irreversível o voltamograma cíclico apresenta picos de corrente que não têm associados picos inversos no varrimento em sentido oposto sendo este um

critério suficiente para identificar um sistema irreversível. Neste caso, o potencial do pico é dependente da velocidade de varrimento sendo cumpridas as relações:

- $|E_p - E_{p/2}| = 47,7/(\alpha n') \text{ (mV)}$
- $|dE_p/d \lg v| = 29,6/(\alpha n') \text{ (mV)}$

onde n' o número de electrões transferidos no passo determinante da velocidade da reacção, e α o coeficiente de transferência de carga electroquímica.

Para um sistema quasi-reversível, a cinética das reacções de oxidação e de redução tem de ser considerada simultaneamente [238].

As espécies adsorvidas na superfície do eléctrodo levam à mudanças na forma do voltamograma cíclico, uma vez que a difusão da solução para a superfície do eléctrodo é eliminada.

Em particular, no caso da adsorção de um reagente ou de um produto de uma reacção de eléctrodo **Figura 1.15**, o voltamograma cíclico é simétrico, com o potencial dos picos de oxidação e redução coincidente.

Na **Figura 1.15** está representado o voltamograma cíclico de uma reacção reversível em que só as espécies adsorvidas O e R contribuem para a reacção total. A curva corrente-potencial para a espécie O adsorvida inicialmente e para uma cinética de eléctrodo é dada por:

$$I_{pa} = nFAv\Gamma / 4RT$$

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

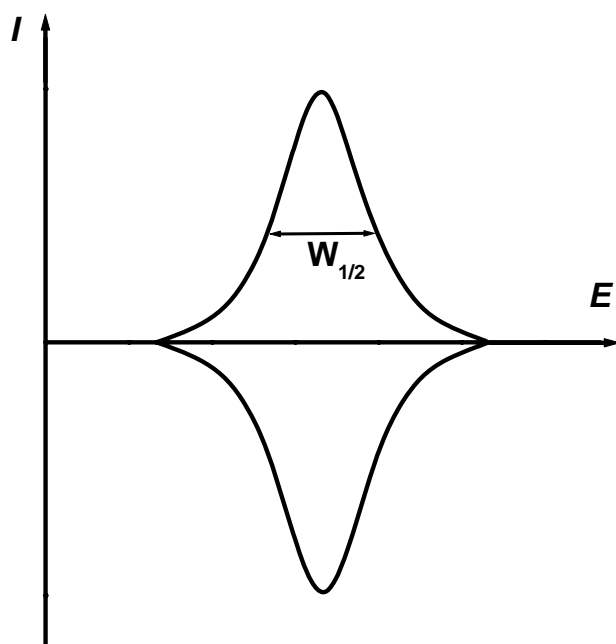


Figura 1.15 Voltamograma cíclico para um sistema reversível de espécies adsorvidas na superfície do eléctrodo.

Esta equação é válida só para velocidades de varrimento inferiores a 10 mV s^{-1} , e para sistemas reversíveis onde o número de electrões transferidos são determinados pela a largura a meia altura do pico de corrente $W_{1/2} = 90,6/n \text{ (mV)}$ [238].

Com o aumento da velocidade de varrimento, o sistema perde a sua reversibilidade e a curva corrente-potencial não continua simétrica devido a um afastamento progressivo dos picos anódico e catódico.

Um sistema electroquímico pode apresentar vários picos anódicos e catódicos, caso a reacção ocorra em diferentes passos consecutivos, ou caso ocorram várias reacções electroquímicas sucessivas. O aparecimento e a posição do segundo pico está relacionado com a primeira reacção electroquímica, e não é sempre fácil obter a resolução do mecanismo. No entanto, através da escolha do intervalo de potencial e dos

potenciais de inversão do varrimento, é possível identificar os picos que aparecem no varrimento inverso ou nos varrimentos seguintes, e relacioná-los com os que ocorrem no varrimento inicial. A partir destas informações, pode ser proposto um mecanismo redox para cada espécie.

Os processos de eléctrodo podem ocorrer antes (*electrochemical-chemical* – EC) ou depois (*chemical-electrochemical* – CE) das reacções químicas homogéneas acopladas. A existência de uma reacção química após o passo de transferência electrónica influencia o voltamograma cíclico.

1.5.2.2 Voltametria de impulso diferencial

As técnicas voltamétricas de impulso baseia-se na diferente velocidade de decaimento das correntes capacitiva e faradaica depois da aplicação de um degrau de potencial (ou "impulso"). A análise da evolução do sistema após a perturbação permite avaliar as reacções no eléctrodo e a velocidade de reacção.

Depois da aplicação de um impulso de potencial, a corrente capacitiva decai exponencialmente com o tempo, enquanto que a corrente faradaica, proveniente da reacção electroquímica decai a uma velocidade inferior, proporcional a $1/t^{1/2}$, a corrente total sendo medida no final do impulso. Este tipo de amostragem tem a vantagem do aumento na sensibilidade [238].

A técnica de voltametria de DP, **Figura 1.16A**, mede a diferença entre duas correntes depois de aplicar impulsos de potencial sucessivos com uma amplitude de impulso ΔE_p em intervalos periódicos de tempo τ [238]. O potencial base é incrementado entre os impulsos, resultando uma rampa ou escada de potencial, com o valor do incremento sendo sempre o mesmo, ΔE_s .

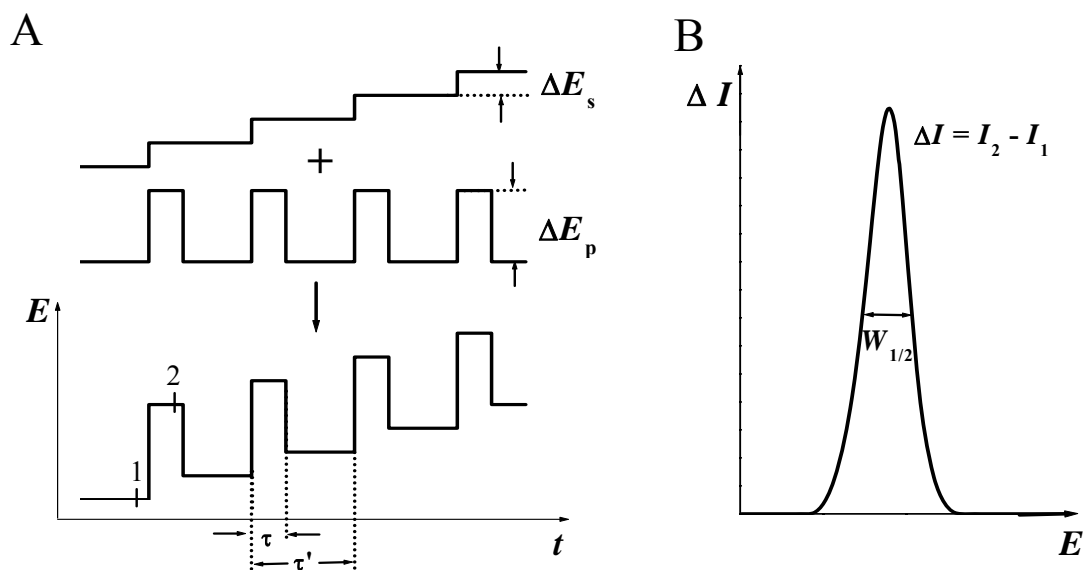


Figura 1.16 (A) Esquema de aplicação de potenciais em voltametria de DP;
 (B) Voltamograma de DP típica [238].

A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso, I_1 , e no final do impulso, I_2 , e a diferença entre as duas correntes é registada, **Figura 1.16B**.

O tempo τ , durante o qual o impulso de potencial é aplicado define a largura do impulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e determina, conjuntamente com o valor de ΔE_s , a velocidade de varrimento $v = \tau \Delta E_s$. Em voltametria de impulso diferencial v varia normalmente entre 1 e 10 mV s^{-1} .

Como esta técnica é um método diferencial, a resposta é semelhante à da primeira derivada de um voltamograma convencional, ou seja, um pico. O potencial do pico, E_p , pode ser identificado com o $E_{1/2}$ para um sistema reversível, mas com o aumento da irreversibilidade o E_p afasta-se do $E_{1/2}$, e ao mesmo tempo a largura do pico aumenta e a sua altura diminui.

Quando a amplitude de impulso $\Delta E_p \rightarrow 0$, a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de electrões transferidos ($91/n$), o que permite caracterizar o mecanismo da reacção de transferência de carga para amplitudes de impulso pequenas. A escolha da amplitude para o impulso de potencial ΔE_p , deve ter em consideração a reacção em estudo e a sensibilidade exigida, uma vez que grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir a detecção da corrente faradaica. A corrente do pico I_p é proporcional à concentração do analítoe à velocidade da reacção electroquímica.

1.5.2.3 Voltametria de onda quadrada

Em voltametria de SW a forma de onda resulta da adição de uma onda quadrada de amplitude de impulso ΔE_p a uma escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s e com um período τ , **Figura 1.17A**.

Na construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eléctrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, a aplicação de um impulso de potencial negativo. A corrente é medida antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, após cada metade do ciclo. A corrente total, ΔI ou I_t que é registada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial directo – corrente directa (*forward current* – I_f), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – corrente inversa (*backward current* – I_b), com a corrente $I(2)$ de sinal contrário a corrente $I(1)$. Esta diferença de correntes é registada em função do potencial aplicado, **Figura 1.17B**, e dela resulta que, para sistemas reversíveis, $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$.

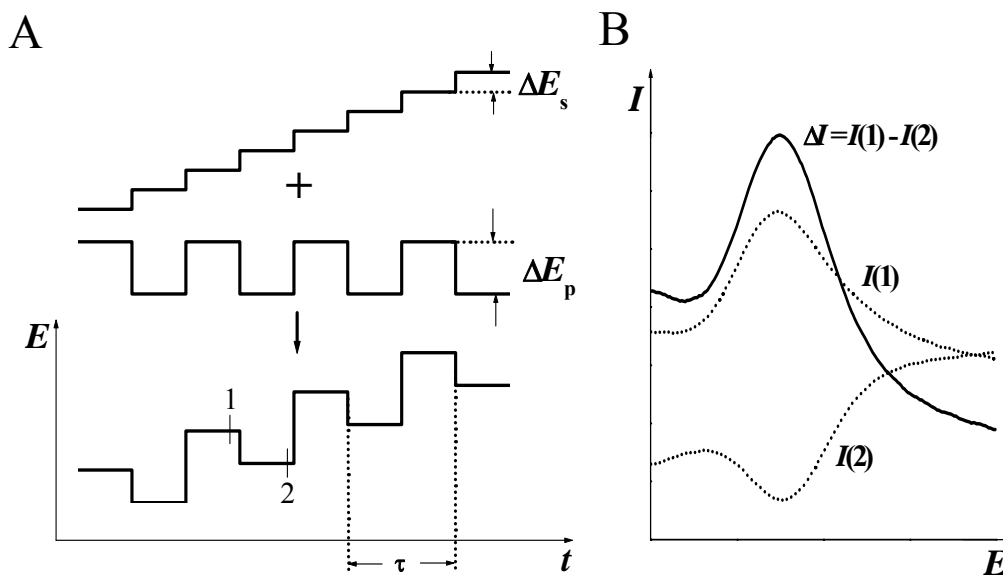


Figura 1.17 (A) Esquema de aplicação de potenciais em voltametria de SW;
 (B) Voltamograma de SW típica [238].

A maior sensibilidade apresentada pela voltametria de SW relativamente à voltametria de DP, no caso de sistemas reversíveis, resulta do tipo de amostragem e tratamento da corrente.

A voltametria de SW permite também uma maior rapidez de análise, sendo possível utilizar velocidades de varrimento efectivas da ordem de $1,0 \text{ V s}^{-1}$, o que diminui o consumo das espécies a analisar e praticamente elimina o bloqueamento da superfície do eléctrodo.

Uma vez que a corrente é exibida em ambos os sentidos, positivo e negativo, as correntes correspondentes à oxidação ou redução da espécie electroactiva na superfície do eléctrodo podem ser obtidas na mesma experiência.

Capítulo 2



Experimental

Neste capítulo são descritos os reagentes, soluções, instrumentação, métodos de investigação, condições experimentais e tratamento de dados utilizados ao longo deste trabalho para a caracterização dos diferentes compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, por métodos electroquímicos de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, para determinar e caracterizar os seus mecanismos de oxidação na superfície de eléctrodos de carbono.

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os compostos foram de qualidade analítica e utilizados sem purificação adicional, **Tabela 2.1**. Todas as soluções de electrólito de suporte e as soluções padrão de cada um dos compostos foram preparadas em água purificada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão descritas ao longo do trabalho e foram preparadas directamente na célula electroquímica, através da diluição do composto de interesse no electrólito de suporte desejado. Os electrólitos de suporte utilizados estão referidos no texto. No entanto, alguns procedimentos experimentais específicos serão enumerados a seguir.

Tabela 2.1 Reagentes e as concentrações das soluções padrão utilizadas.

Substância	Abreviatura	Concentração padrão	Proveniência
Ácido acetilsalicílico	ASA	10 mM	Sigma-Aldrich
Ácido salicílico	SA	10 mM	Sigma-Aldrich
Ácido 2-(oxiacetil)-4-(trifluorometil) benzóico	TRF	10 mM	Apin Chemicals Ltd.
Ácido 2-hidróxi-4-(triflorometil) benzóico	HTB	10 mM	Apin Chemicals Ltd.
Fenol	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Catecol	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Hidroquinona	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Resorcinol	–	1 mM	Sigma-Aldrich
4-ethylfenol	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Tirosina	Tyr / Y	1 mM	Sigma-Aldrich
Tiramina	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Dopamina	–	1 mM	Sigma-Aldrich
indol	–	1 mM	Sigma-Aldrich
indol-3-acetamida	IAM	1 mM	Sigma-Aldrich
Triptamina	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Gramina	–	1 mM	Sigma-Aldrich
Ácido indol acético	IAA	1 mM	Sigma-Aldrich
Ácido indol propiônico	IPA	1 mM	Sigma-Aldrich
Ácido indol butírico	IBA	1 mM	Sigma-Aldrich
Triptofano	Trp / W	1 mM	Sigma-Aldrich
Sanguinarina	–	25 mM	Sigma-Aldrich
Berberina	–	25 mM	Sigma-Aldrich
Histidina	His / H	1 mM	Sigma-Aldrich
Cisteina	Cys / C	1 mM	Sigma-Aldrich
Metionina	Met / M	1 mM	Sigma-Aldrich
Poli-tirosina	Poli-Y	n/a	Sigma-Aldrich
Poli-triptofano	Poli-W	n/a	Sigma-Aldrich
Metionina sulfóxido redutase A	MsrA	0,33 mg/mL	Sigma-Aldrich

Para dosear os micro-volumes das soluções preparadas e utilizadas ao longo do trabalho experimental, foram utilizadas pipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P 20 da Gilson S.A., Villiers-le-Bel, França, e micropipetas computadorizadas EP-10 e EP-100 Plus da Rainin Instruments Co. Inc., Woburn, USA.

Tabela 2.2 Composição das soluções de electrólito de suporte.

Electrólito de suporte	pH
H ₂ SO ₄	1,0
HCl + KCl	2,1
HAcO + NaAcO	3,3
HAcO + NaAcO	4,5
HAcO + NaAcO	5,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	6,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	7,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	8,0
NaHCO ₃ + NaOH	9,0
NaHCO ₃ + NaOH	10,0
NaHCO ₃ + NaOH	11,0
NH ₃ + NH ₄ Cl	12,0

As soluções de electrólito de suporte de diferentes pH, com força iónica igual a 0,1 M, foram preparadas em conformidade com a **Tabela 2.2**, a partir de reagentes de pureza analítica. As medições de pH foram realizadas com um medidor de pH Crison micropH 2001 com um eléctrodo de vidro Ingold.

Relativamente a todos outros compostos investigados, as soluções padrão foram armazenadas no frigorífico a 4°C.

2.2 INSTRUMENTAÇÃO

As experiências de voltametria foram efectuadas utilizando um potenciostato μ Autolab II, da Metrohm/Autolab, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciostático e controlado pelo programa GPES (*General Purpose Electrochemical System*), versão 4.9, Metrohm / Autolab, Utrecht, Holanda, **Figura 2.1**.



Figura 2.1 Potenciostato μ Autolab Type II.

Os espectros de absorção foram registados utilizando o espectrofotómetro UV-Vis SPECORD S100 da Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha, com o programa Win Aspect. As condições experimentais para os espectros de absorção foram: tempo de integração de 25 ms e acumulação de espectros de 1000. Todos os espectros de UV-Vis foram medidos a partir de 190 nm até 350 nm.

2.3 PARÂMETROS VOLTAMÉTRICOS

O controlo dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foi efectuado com o programa GPES, versão 4,9, Metrohm / Autolab, Utrecht, Holanda.

Para as medidas de voltametria cíclica foi sempre utilizado um degrau de potencial $\Delta E_s = 2$ mV. Em todos os ensaios realizados por voltametria de DP, foram utilizados os seguintes parâmetros: largura do impulso 70 ms, amplitude de impulso 50 mV e velocidade de varrimento $v = 5$ mV s⁻¹.

Durante as medidas por voltametria de SW foram sempre utilizados os seguintes parâmetros: o degrau de potencial a $\Delta E_s = 2$ mV e a amplitude de impulso a 50 mV. A frequência do impulso foi modificada em função das necessidades de cada experiência.

2.4 CÉLULA ELECTROQUÍMICA

Todas as experiências foram efectuadas numa célula electroquímica de um único compartimento com uma capacidade volumétrica máxima de 3 mL, **Figura 2.2**, à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C. Utilizaram-se como eléctrodos de trabalho um eléctrodo de carbono vítreo (GCE), referência 66-EE042 da Cypress Systems, com diâmetro $\Phi = 1,5$ mm, e um eléctrodo de diamante dopado com boro (BDDE) com as dimensões de 5×5 mm². Os eléctrodos de referência foram: Ag/AgCl, referência EE008 da Cypress Systems, e Calomelano, referência REF401 da Radiometer Analytical. Como eléctrodo auxiliar utilizou-se um fio de platina.



Figura 2.2 Célula electroquímica e eléctrodos utilizados.

O filme de diamante dopado com boro foi preparado no Centro de Electronique et de Microtechnique SA (CSEM), Neuchâtel, Suíça, em pastilha de silício, pela técnica de deposição química em fase vapor assistida por filamento quente (HF-CVD), com a temperatura do filamento no intervalo 2440 – 2560 °C, numa mistura gasosa contendo H₂, metano e trimetilboro. Este processo de HF-CVD permitiu obter um filme policristalino, com a superfície dominada por facetas {1 1 1}. O conteúdo final de boro foi da ordem de 8000 ppm, com uma superfície de 5,5 x 5,5 mm² e 1µm grossura [7].

Relativamente às experiências efectuadas com o GCE, antes de cada experiência a superfície do eléctrodo foi limpa mecanicamente e condicionada electroquimicamente. A limpeza mecânica envolve o polimento com *spray* de grão de diamante de tamanho 1 μ m, seguida por uma lavagem com etanol e com água desionizada Milli-Q. O condicionamento electroquímico da superfície do GCE foi efectuado depois da limpeza mecânica através do registo de vários varrimentos de voltametria cíclica, de DP ou SW, na solução de electrólito de suporte, até a resposta electroquímica permanecer inalterável.

Relativamente às experiências efectuadas com o BDDE, para obter resultados qualitativamente reprodutíveis, um pré-tratamento físico e electroquímico foi aplicado ao eléctrodo antes de efectuar cada estudo voltamétrico. O eléctrodo foi lavado com etanol e água Milli-Q, e foram investigados diferentes procedimentos catódicos e anódicos para a “activação” da superfície do BDDE. Os melhores resultados foram obtidos por voltametria cíclica, em cada solução de electrólito suporte, até que um sinal estável foi registado (15-20 varrimentos com uma velocidade de varrimento de 150 mV s⁻¹). Os voltamogramas foram registados entre os limites do potencial de $E_1 = 0,0$ V e $E_2 = + 2,50$ V para o pré-tratamento anódico e $E_1 = 0,0$ V e $E_2 = - 2,50$ V para o pré-tratamento catódico. O procedimento anódico foi utilizado para o estudo electroquímico da ASA e do TRF, enquanto que o procedimento catódico foi utilizado para o estudo dos aminoácidos e da metionina sulfóxido reductase A.

2.5 TRATAMENTO DOS DADOS

Alguns voltamogramas cíclicos, de DP ou de SW foram previamente sujeitos à subtração do voltamograma obtido nas mesmas condições experimentais em solução de electrólito de suporte. Outros voltamogramas de DP foram sujeitos à correcção de linha de base realizada com o programa GPES, através de um algoritmo matemático *moving average*, utilizando um degrau de 3 mV. Este tratamento matemático melhora a visualização e facilita a identificação dos picos, sem a introdução de qualquer artefacto, embora em alguns casos, a intensidade pico seja reduzida (<10%) em relação à do voltamograma original, como está exemplificado na **Figura 2.3**.

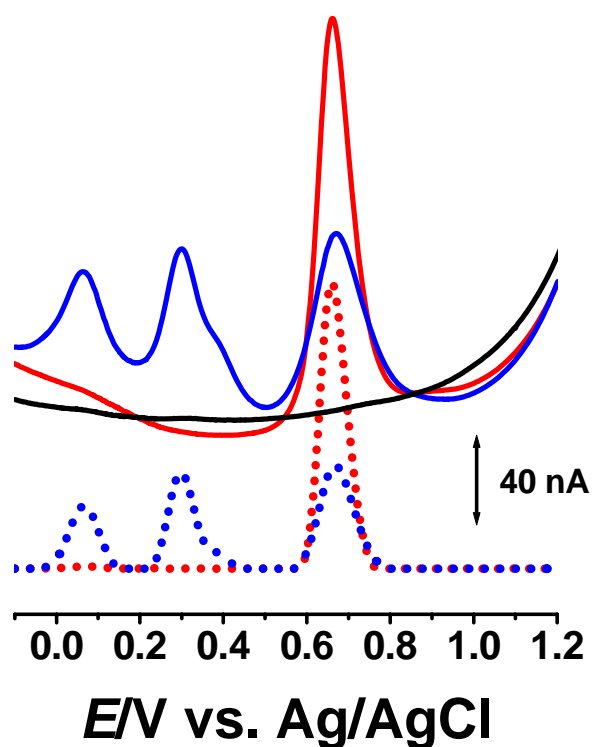


Figura 2.3 Voltamogramas de DP obtidos em (—) electrólito de suporte e numa solução de 25 μM de fenol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (—) primeiro e (—) segundo varrimento originais, e (•••) primeiro e (•••) segundo varrimento após a correcção da linha de base usando o algoritmo *moving average*.

Os valores de corrente dos picos apresentadas em todos os gráficos foram determinados a partir dos voltamogramas originais sem tratamento, após a subtração da linha de base.

Todos os voltamogramas electroquímicos e espectros de absorvância estão apresentados utilizando o programa ORIGIN, versão 6.0 da Microcal Software, Inc., USA. Os algoritmos *Savitsky-Golay*, *adjacent averaging* e *FFT Filter* foram utilizados sempre que houve necessidade de eliminar o ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

Os programas CHEMDRAW ULTRA, versão 8.0, da Cambridge Soft Corporation e VMD (*Visual Molecular Dynamics*), versão 1.8.7, da Universidade de Illinois, foram utilizados para desenhar as estruturas químicas das moléculas.

Capítulo 3

Eléctrodo de diamante dopado com boro

3.1 INTRODUÇÃO

O BDDE tem um excelente desempenho na detecção e/ou degradação dos compostos orgânicos através da oxidação electroquímica. Uma das propriedades mais importantes do BDDE é a sua larga janela de potencial, de cerca de - 3,5 V a + 3,5 V. Esta característica, particularmente para o intervalo de potenciais positivos, abre novas possibilidades na investigação na área da electroquímica e electroanálise, permitindo estudos de oxidação que não são possíveis com outros eléctrodos.

Em meio aquoso, aplicando um potencial elevado à superfície do BDDE tem lugar a decomposição da água e a ocorrência das condições termodinâmicas favoráveis para a formação de radicais hidróxilo (HO^\bullet) [2, 7]. A reactividade dos compostos oxidados electroquimicamente no BDDE está directamente relacionada com a sua interacção com os radicais hidróxilo gerados na superfície de eléctrodo [243 - 254]. Por esta razão, a caracterização da formação de radicais hidróxilo na superfície do BDDE em electrólitos de suporte aquosos é muito importante para a compreensão dos mecanismos electroquímicos de interacção dos compostos orgânicos e investigados.

A morfologia do BDDE utilizado foi caracterizada por microscopia de força atómica (*atomic force microscopy* – AFM) e microscopia electrónica de varrimento (*scanning electron microscopy* – SEM) Os radicais hidróxilo electroquimicamente gerados *in situ* num BDDE foram investigados utilizando voltametria de DP, em diferentes electrólitos de suporte com valores de pH compreendidos entre 1 e 12 [7].

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica da superfície do BDDE foi efectuada por SEM e AFM. Tanto as imagens de SEM, **Figuras 3.1A e 3.1B**, como as imagens de AFM, **Figuras 3.1C e 3.1D**, mostraram uma superfície contínua e rugosa, consistindo em grãos com tamanhos muito heterogéneos, de 0,2 μm até 1 μm .

Nas imagens de AFM com o tamanho de varrimento de 4000 x 4000 nm^2 , **Figura 3.1C**, foi calculada a rugosidade RMS (*root mean square*) de 35,7 nm do filme policristalino do BDD. As medidas de rugosidade foram efectuadas sobre a área inteira da imagem, e o parâmetro rugosidade RMS representa o desvio padrão das alturas z na imagem topográfica, calculado a partir da equação:

$$\text{Rugosidade RMS} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{\text{selecção}} (z_i - z_{\text{média}})^2}$$

onde z_i é o valor da altura z no ponto i , n é o número de pontos na imagem e $z_{\text{média}}$ representa o valor médio da altura z , calculado pela fórmula:

$$z_{\text{média}} = \frac{1}{n} \sum_{\text{selecção}} z_i$$

Nas imagens de AFM, **Figura 3.1D**, com maior ampliação foi possível observar que os grãos são cristais microcristalinos de diamante orientados aleatoriamente, com as faces bem definidas.

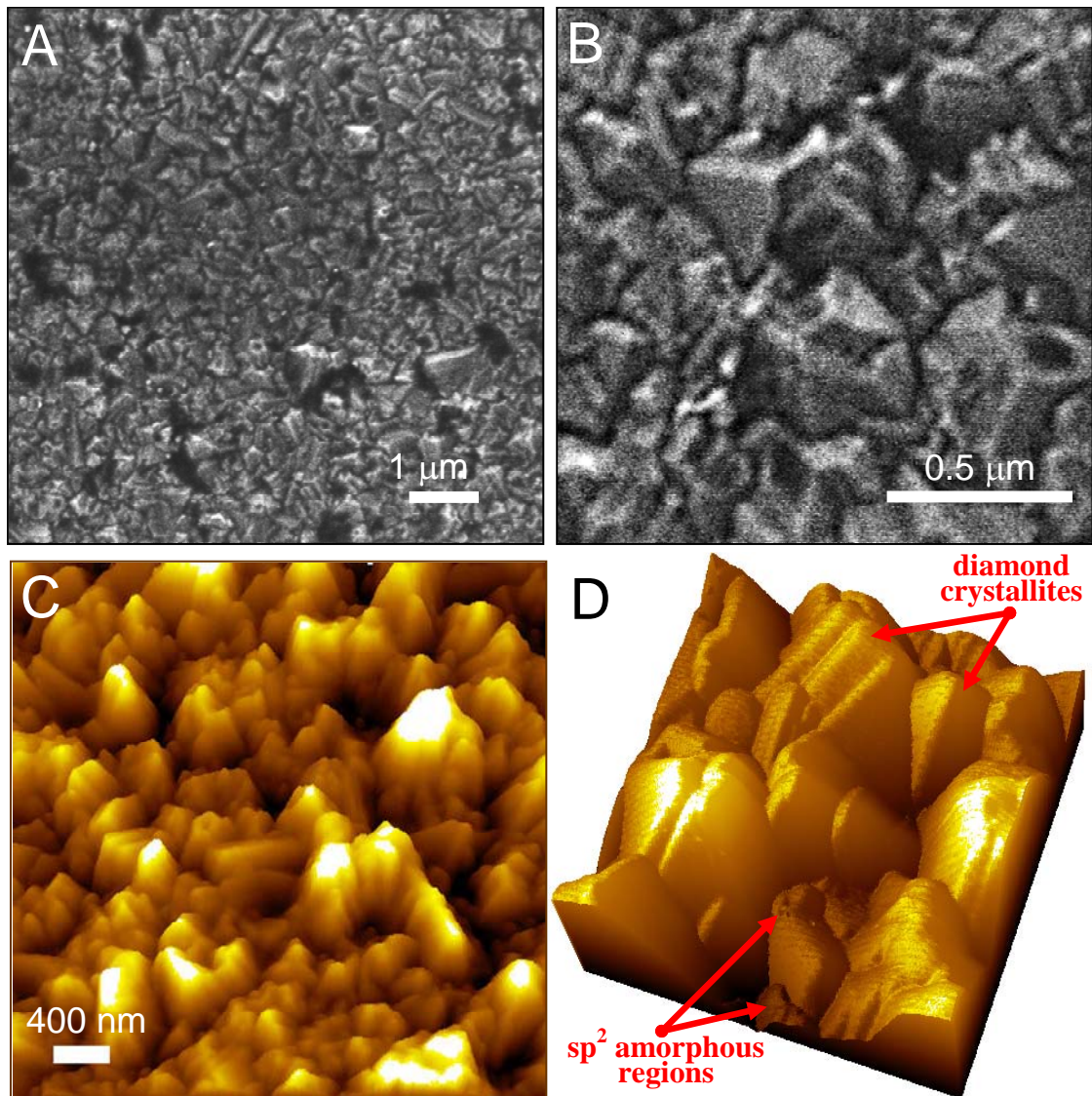


Figura 3.1 Caracterização morfológica da superfície de BDDE: (A, B) imagens de SEM e (C, D) imagens de AFM.

As imagens de AFM mostraram ainda a existência dum número elevado de faces triangulares, relacionadas com a orientação {111} dos planos de diamante expostos. Nas margens dos cristais microcristalinos de diamante foram também observados pequenos agregados com forma globular e estrutura polimórfica.

Considerando que o BDD é sintetizado em condições semelhantes às da síntese de grafite, na sua estrutura podem estar incorporados pequenos agregados de carbono cujas estruturas são diferentes das do diamante. Deste modo, os pequenos agregados globulares observados nas imagens de AFM podem estar associados às regiões amorfas de carbono com hibridização sp^2 [244].

3.3 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA

A aplicação de um potencial positivo elevado à superfície do BDDE numa solução aquosa conduz à decomposição da água e à formação *in situ*, na superfície do BDDE, de forma controlada, de radicais hidróxilo. A geração electroquímica *in situ* de radicais hidróxilo no BDDE foi estudada por voltametria de DP em soluções de electrólito de suporte com valores de pH entre 1 e 12. Todos os voltamogramas apresentados foram registados entre os limites de potencial de $E_1 = 0,0 \text{ V}$ e $E_2 = + 2,50 \text{ V}$. Para todos electrólitos de suporte investigados, na região de potencial de $+ 0,10 \text{ V}$ a $+ 1,20 \text{ V}$, foram observados alguns picos de oxidação muito pequenos.

Os voltamogramas de DP registados para electrólitos de suporte com $1,0 < \text{pH} < 9,0$ estão apresentados na **Figura 3.2A**. O primeiro voltamograma foi registado em ácido sulfúrico com $\text{pH} = 1,0$ e mostra dois picos de oxidação, P_1 a $E_{pa}^{P1} = + 1,55 \text{ V}$, $I_{pa}^{P1} = 3 \mu\text{A}$ e P_2 a $E_{pa}^{P2} = + 2,10 \text{ V}$, $I_{pa}^{P2} = 1,9 \mu\text{A}$.

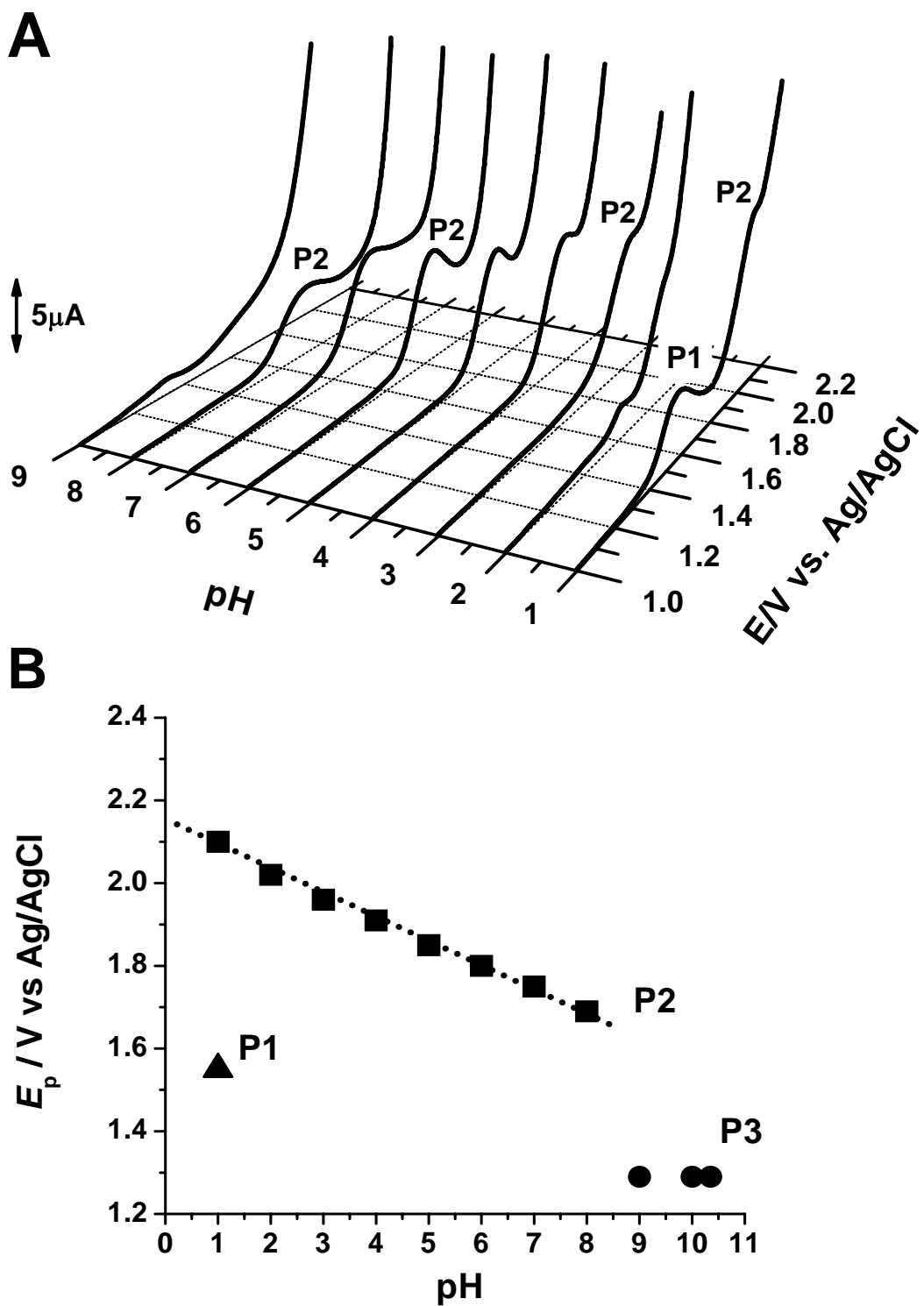


Figura 3.2 (A) Voltamogramas de DP obtidos com BDDE em electrólitos de diferentes pH; (B) Gráfico da variação com o pH do: (\blacktriangle) E_p^1 do P₁, (\blacksquare) E_p^2 do P₂, e (\bullet) E_p^3 do P₃.

Com o aumento do valor de pH do electrólito de suporte, o potencial do pico P₂ deslocou-se para valores menos positivos e a corrente do pico diminuiu até pH = 9,0 onde se notou o desaparecimento do pico P₂, **Figuras 3.2A e 3.2B**. A dependência do potencial do pico P₂ com o pH foi linear, seguindo a relação $E_{pa}^{P_2}(\text{V}) = 2,160 - 0,059 \text{ pH}$, **Figura 3.2B**.

A inclinação da recta na **Figura 3.2B** é de 59 mV por unidade de pH, mostrando que o mecanismo de oxidação envolve o mesmo número de electrões e protões. A largura a meia altura do pico, $W_{1/2} \sim 110 \text{ mV}$, está próxima do valor teórico de 90 mV, correspondente a uma reacção electroquímica que envolve a transferência de um electrão [238]. Por esta razão é possível concluir que a reacção de oxidação correspondente ao pico P₂ ocorreu com a transferência de um electrão e um protão. Este pico está associado com a decomposição electroquímica da água e a geração de radicais hidroxilo na superfície do BDDE.



Quando o BDDE é utilizado em estudos electroquímicos e electroanalíticos de compostos orgânicos, os radicais hidróxilo gerados no eléctrodo podem interagir com os compostos investigados [244-252]. De facto, em função do potencial aplicado, a oxidação dos compostos orgânicos de interesse pode ocorrer seguindo dois tipos de mecanismos. O primeiro mecanismo de oxidação está relacionado com a oxidação electroquímica directa do composto na região de estabilidade da água, antes da evolução de oxigénio, onde podem ocorrer as reacções que envolvem apenas a transferência simples de electrão. O segundo mecanismo tem em conta a oxidação electroquímica indirecta do composto, na região de potencial de evolução do oxigénio (decomposição

de água), causada por uma sequência de reacções que é iniciada pelos radicais HO• formados na superfície do BDDE [7]. De facto, devido à rápida reactividade destes radicais, as reacções electroquímicas estão confinadas ao um filme fino de HO• formado e adsorvido por instantes na superfície do eléctrodo [244, 246, 251].

Como observado nas imagens de AFM, **Figura 3.1D**, o BDDE pode apresentar na sua estrutura pequenas impurezas, regiões amorfas de carbono com hibridização sp^2 [244], cuja electroactividade influencia a corrente do fundo e a janela de potencial de trabalho do BDDE. Os pequenos picos observados no intervalo de potencial entre $E_{P1} = + 0,10$ V e $E_{P2} = + 1,20$ V, bem como o pico P_1 , dependem do carbono sp^2 incorporado na estrutura de diamante, que desempenha o papel de centro electrocatalítico, levando à formação de grupos funcionais na superfície do eléctrodo.

No BDDE com estrutura mono-cristalina o pico P_1 não ocorre, enquanto que, no BDDE poli-cristalino de qualidade menos elevada, esta oxidação é muito extensa, de modo que o pico da evolução de oxigénio não se distingue com precisão [242-245].

Os potenciais elevados observados para a evolução de oxigénio em diferentes electrólitos de suporte estudados sugerem que o BDDE sofre pouca interacção com o electrólito de suporte, de acordo com o facto que a superfície de BDDE é inerte.

Nos voltamogramas de DP obtidos em soluções tampão de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ com valores de pH no intervalo 9,0 – 11,0 e NaOH com pH = 11,5, **Figura 3.3A**, o pico P_2 não foi observado, provavelmente como consequência da rápida reacção dos radicais hidróxilo com as moléculas de carbonato e bicarbonato do eléctrodo de suporte [253, 254].

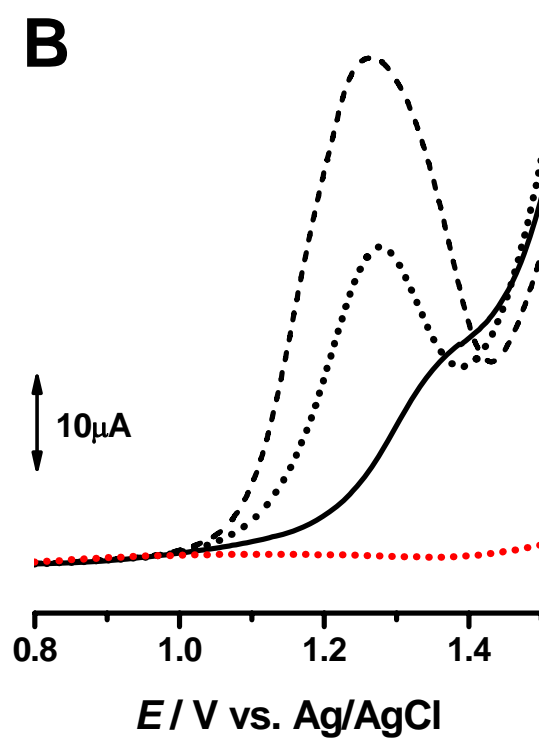
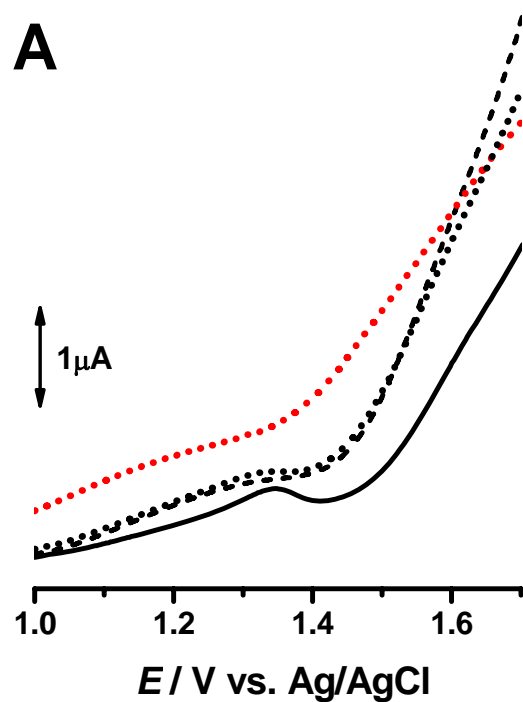


Figura 3.3 Voltamogramas de DP obtidos com o BDDE em electrólitos de suporte de diferentes composições e valores de pH: (A) $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (—) pH = 9,0, (---) pH = 10,0, (•••) pH = 11,0; NaOH (•••) pH = 11,5 e (B) $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (—) pH = 8,9, (•••) pH = 10,0, (---) pH = 10,5 e NaOH (•••) pH = 11,5.

Em soluções de electrólito de suporte de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ com valor de pH entre 8,9 e 10,5, **Figura 3.3B**, como esperado, não ocorre o pico P_2 e foi observado outro processo oxidativo, pico P_3 a $E_{\text{pa}}^{\text{P}_3} = + 1,25$ V. O pico P_3 foi observado apenas em soluções de electrólitos de suporte contendo amónia, o seu potencial é independente do pH e é atribuído à oxidação da amónia no BDDE [254].

Relativamente às aplicações electroanalíticas, os picos relacionados com a actividade electroquímica do carbono sp^2 do BDDE são normalmente ocultados pela corrente do pico de oxidação das soluções com concentração elevada utilizadas no estudo dos compostos orgânicos electroactivos [246-249]. No entanto, nas aplicações electroquímicas que envolvem uma concentração baixa do composto electroactivo, o BDDE não pode ser considerado inerte. Deste modo, para uma correcta interpretação dos resultados electroquímicos, as interacções tanto dos radicais hidróxilo electrogerados *in situ* no BDDE, que reagem com os compostos orgânicos de interesse, como do electrólito do suporte com as regiões funcionais sp^2 da superfície do BDDE devem ser consideradas com especial atenção.

3.4 CONCLUSÕES

A geração electroquímica *in situ* de radicais hidróxilo no BDDE foi investigada por voltametria de DP em diferentes soluções de electrólito de suporte, numa ampla gama de pH.

Para valores de $\text{pH} < 9$ foi observado um pico de oxidação na região de evolução do oxigénio, que ocorre com a transferência de um electrão e um protão. Este pico corresponde à geração electroquímica de radicais hidróxilo, que podem interagir e

oxidar compostos orgânicos. Em electrólitos com $\text{pH} > 9$ não foi observada a produção de radicais hidróxilo. Contudo, em soluções de tampão amónia foi observado um pico de oxidação independentemente do pH que corresponde à oxidação do amónia. Ainda, foram observados alguns pequenos picos de oxidação associados à actividade electroquímica de grupos funcionais formados pelas espécies de carbono não-diamante, hibridizado sp^2 , existentes na superfície do eléctrodo, o que sugere que o BDDE é relativamente não-reactivo, mas não completamente inerte.

Os resultados obtidos mostram a importância da caracterização do comportamento electroquímico de BDDE em diferentes soluções de electrólito de suporte, antes de efectuar estudos electroquímicos de compostos orgânicos, de modo a esclarecer e avaliar correctamente todos os factores que influenciam o mecanismo redox dos compostos orgânicos de interesse e o papel desempenhado pelos radicais hidróxilo gerados electroquimicamente *in situ* na superfície do BDDE.

Capítulo 4

Estudo voltamétrico de compostos fenólicos

4.1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objectivos da investigação científica está ligado à prevenção de doenças, à qualidade e segurança alimentar e à qualidade do meio ambiente, com vista a melhorar a qualidade de vida. Neste contexto, o estudo de derivados de fenol, **Figura 4.1**, é fundamental, uma vez que estes compostos estão envolvidos na constituição de muitas hormonas, vitaminas e aminoácidos, apresentando também propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, e antioxidantes.

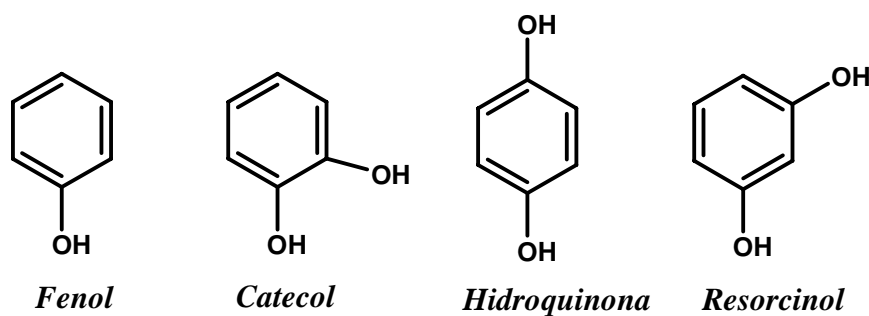


Figura 4.1 Estrutura química do fenol, catecol, hidroquinona e resoscinol.

Neste capítulo é apresentado o estudo das propriedades de transferência de electrões do fenol e de vários derivados de fenol, realizado na superfície do GCE, a fim de elucidar os mecanismos redox dos fenóis naturais ou sintéticos, para uma melhor compreensão das suas relações quantitativas de estrutura-actividade (QSAR).

4.2 FENOL

O comportamento electroquímico do fenol e o seu mecanismo redox foram estudados por técnicas de voltametria cíclica, de DP e de SW, utilizando o GCE. A identificação dos produtos de oxidação do fenol foi efectuada através da comparação dos resultados voltamétricos obtidos para o fenol com os obtidos para os seus produtos de hidroxilação, catecol, hidroquinona e resorcinol, **Figura 4.1** [1].

4.2.1. Voltametria cíclica

As experiências de voltametria cíclica foram realizadas numa solução de 30 μM de fenol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, saturada com N_2 , **Figura 4.2**. No decorrer das experiências voltamétricas foi mantido um fluxo constante de N_2 à superfície da solução, de modo a evitar a difusão de oxigénio atmosférico para o interior da solução.

A oxidação do fenol ocorre num único passo, pico de oxidação 1_a , ao potencial $E_{pa}^1 = + 0,71 \text{ V}$. No varrimento catódico foram observados dois picos de redução, o pico 3_c , a $E_{pc}^3 = + 0,40 \text{ V}$, e o pico 2_c , a $E_{pc}^2 = + 0,29 \text{ V}$, correspondentes à redução dos produtos de oxidação do fenol formados no pico 1_a .

Ao realizar um segundo varrimento sem limpar a superfície do eléctrodo, ocorreram dois picos anódicos, o pico 2_a , a $E_{pa}^2 = + 0,33 \text{ V}$, e o pico 3_a , a $E_{pa}^3 = + 0,43 \text{ V}$.

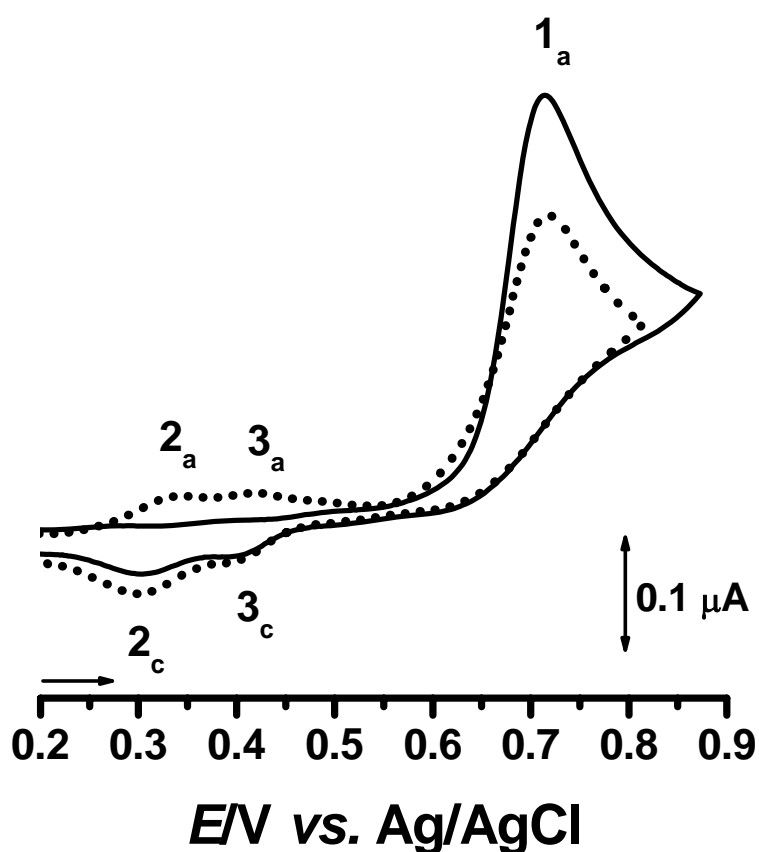


Figura 4.2 Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de 30 μM de fenol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (●●●) segundo varrimento, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

As diferenças entre os potenciais anódicos e catódicos dos picos, $|E_{pa}^2 - E_{pc}^2| = 40 \text{ mV}$ e $|E_{pa}^3 - E_{pc}^3| = 30 \text{ mV}$ estão próximas do valor teórico de 30 mV, o que indica que os picos 2 e 3 correspondem a processos de oxidação-redução reversíveis, com a transferência de dois electrões [238]. Ao mesmo tempo foi observada uma diminuição da corrente do pico 1_a, devido à adsorção dos produtos do oxidação do fenol na superfície do eléctrodo.

4.2.2 Voltametria de impulso diferencial

Os voltamogramas de DP foram registados em soluções de 25 μM de fenol em diferentes electrólitos de suporte com força iónica 0,1 M, usando sempre uma superfície limpa de GCE, **Figura 4.3**.

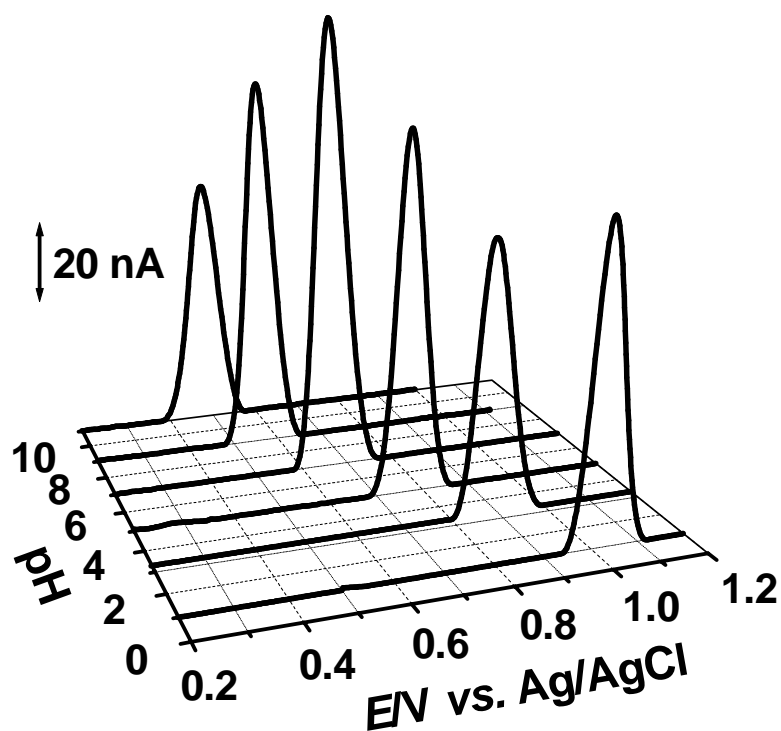


Figura 4.3 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos em soluções de 25 μM de fenol em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

Em todos os electrólitos estudados, a oxidação do fenol ocorreu num único passo, correspondente a um pico de oxidação 1_a . O potencial de oxidação do pico 1_a é dependente do pH. A dependência é linear e descrita através da equação $E_p \text{ (V)} = 1,080 - 0,060 \text{ pH}$, **Figura 4.4**.

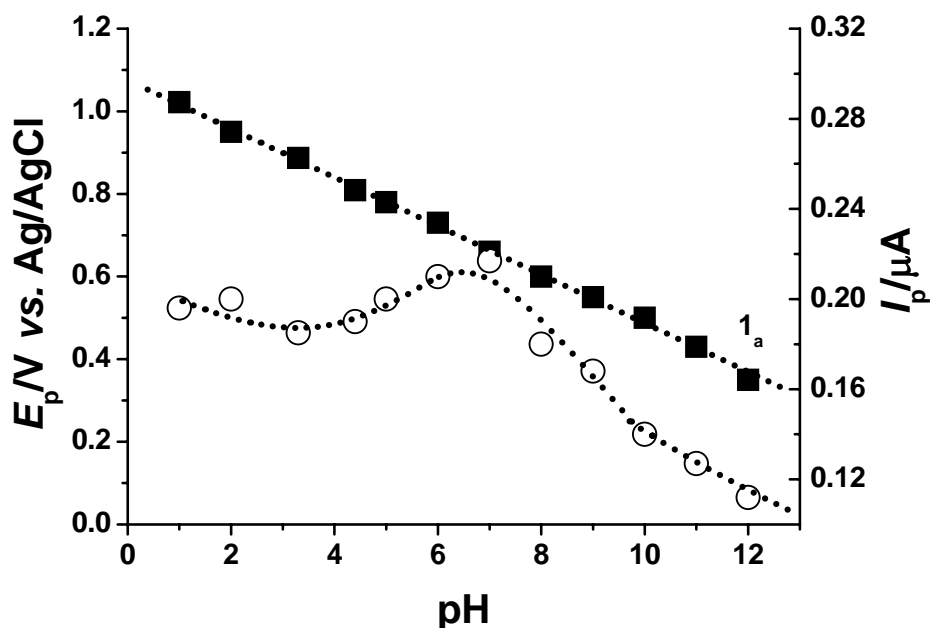


Figura 4.4 Gráfico da variação com pH do (■) E_p^1 e da (○) I_p^1 do pico 1_a.

A inclinação da recta, 60 mV por unidade de pH, mostra que a oxidação do fenol no GCE em meio aquoso envolve o mesmo número de electrões e protões [238].

Considerando que a largura a meia altura do pico 1_a, $W_{1/2} \sim 100$ mV, conclui-se que o processo de oxidação do fenol envolve a transferência de um electrão e um protão. O pico 1_a apresenta um máximo de corrente em electrólito de suporte com pH neutro, **Figura 4.4**.

Voltamogramas de DP sucessivos foram registados numa solução de 25 μM de fenol em electrólitos de suporte com pH entre 1,0 e 12,0. No segundo varrimento de DP, registado na mesma solução e sem limpar a superfície de eléctrodo, apareceram para todos os pHs dois picos anódicos, 2_a e 3_a, correspondentes à oxidação dos dois produtos de oxidação do fenol, **Figura 4.5**.

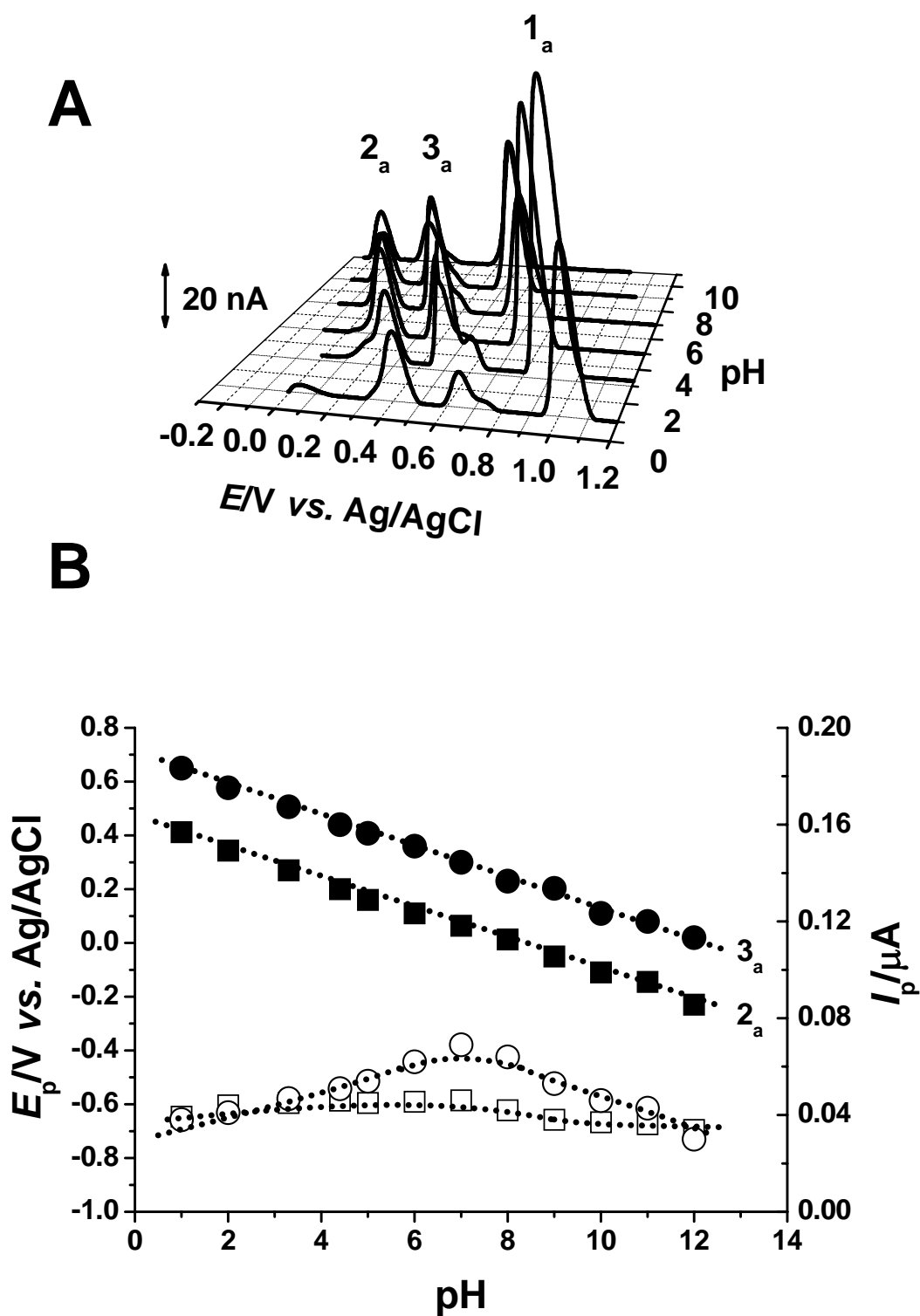


Figura 4.5 (A) Segundos voltammogramas de DP, com correção de linha de base, obtidos em soluções de 25 μM de fenol em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^2 e da (□) I_p^2 do pico 2_a e do (●) E_p^3 e da (○) I_p^3 do pico 3_a.

Os picos 2_a e 3_a são dependentes do pH e os potenciais de oxidação diminuem linearmente com o aumento do pH da solução de electrólito de suporte, **Figura 4.5B**. Em ambos os casos, as inclinações das rectas foram de 60 mV por unidade de pH, o que significa que o número de protões transferidos durante a oxidação de cada um dos produtos de oxidação do fenol é igual ao número de electrões. Considerando que a largura do pico a meia altura variou entre 55 e 65 mV para os dois picos, é possível concluir que o mecanismo de oxidação de cada um dos produtos de oxidação do fenol envolve a transferência de dois electrões e dois protões.

A corrente dos picos de oxidação 2_a e 3_a mostrou um valor máximo em soluções de electrólito de suporte com pH neutro. A corrente do pico 1_a diminuiu com o número de varrimentos, devido à diminuição da área disponível da superfície de eléctrodo, causada pela adsorção dos produtos de oxidação.

Para identificar os produtos de oxidação do fenol, a oxidação electroquímica dos isómeros benzenodiol hidroquinona, catecol e resorcinol, foi estudada por voltametria de DP em soluções de 25 µM em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 4.6**. Para cada composto, dois voltamogramas de DP consecutivos foram registados entre 0,0 V e + 1,0 V, na superfície limpa do GCE, utilizando soluções novas para cada experiência.

Os comportamentos electroquímicos da hidroquinona e do catecol foram semelhantes, **Figuras 4.6B e 4.6C**. Para ambos os isómeros, no primeiro varrimento de DP foi obtido apenas um pico anódico 1_a, a $E_p = + 0,08$ V para a hidroquinona, e a $E_p = + 0,20$ V para o catecol. A oxidação do resorcinol ocorre a um potencial superior, $E_p = + 0,60$ V, **Figura 4.6D**. A corrente do pico de oxidação de todos os compostos estudados sofreu um ligeira diminuição com o número de varrimentos.

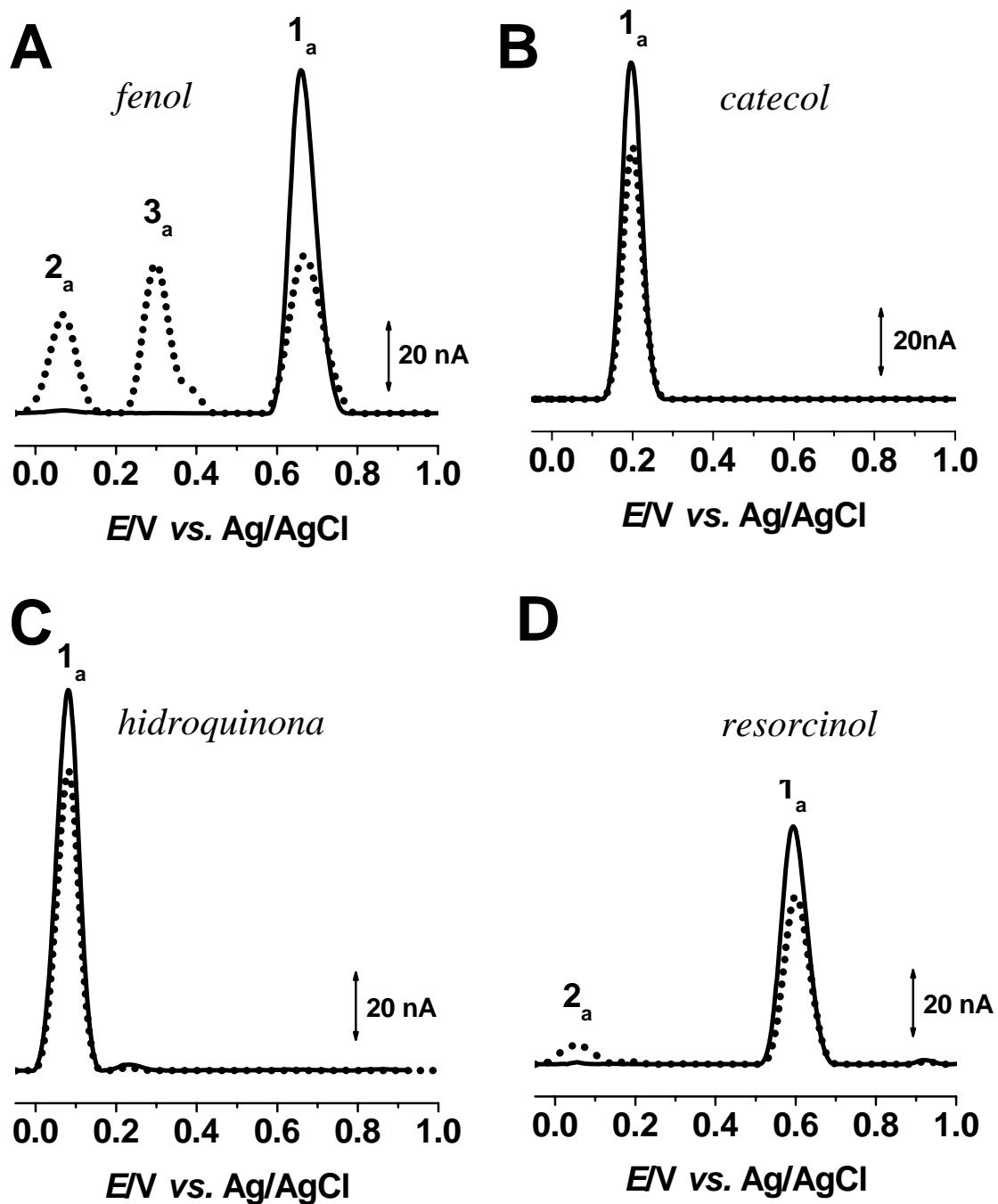


Figura 4.6 Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, registados em 0.1 M tampão fosfato pH = 7.0, para soluções de 25 μ M de: (A) fenol, (B) catecol, (C) hidroquinona e (D) resorcinol; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

A hidroquinona e o catecol sofreram uma oxidação reversível, com a transferência de dois electrões e dois protões [21, 35]. O potencial de oxidação do resorcinol é mais elevado pelas diferenças na reactividade desses isómeros.

Considerando que, para uma molécula de fenol, as posições *orto* e *para* apresentam uma densidade electrónica mais elevada, a reactividade do anel aromático aumenta quando um grupo OH adicional está numa destas posições [22, 23]. Deste modo, a hidroquinona e o catecol têm anéis aromáticos activados e oxidam-se para valores de potencial menos positivos, enquanto que o anel do resorcinol não está activado, sendo a sua oxidação mais difícil.

4.2.3 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de SW registados numa solução de 25 μM de fenol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, mostraram características semelhantes à voltametria de DP: o primeiro varrimento apresentou um pico de oxidação 1_a a $E_p = + 0,66 \text{ V}$, **Figura 4.7A**, e no segundo varrimento ocorreram dois picos, correspondentes à oxidação dos produtos de oxidação do fenol, o pico 2_a a $E_p = 0,08 \text{ V}$ e pico 3_a a $E_p = 0,33 \text{ V}$, **Figura 4.7B**.

A irreversibilidade do pico 1_a do fenol foi confirmada após a desconvolução da corrente total nas suas componentes directa (I_f – *forward current*) e inversa (I_b – *backward current*), **Figura 4.7A**. A componente directa mostrou um pico ao mesmo potencial e com a mesma corrente que a corrente total, enquanto que na componente inversa não aparece nenhum pico.

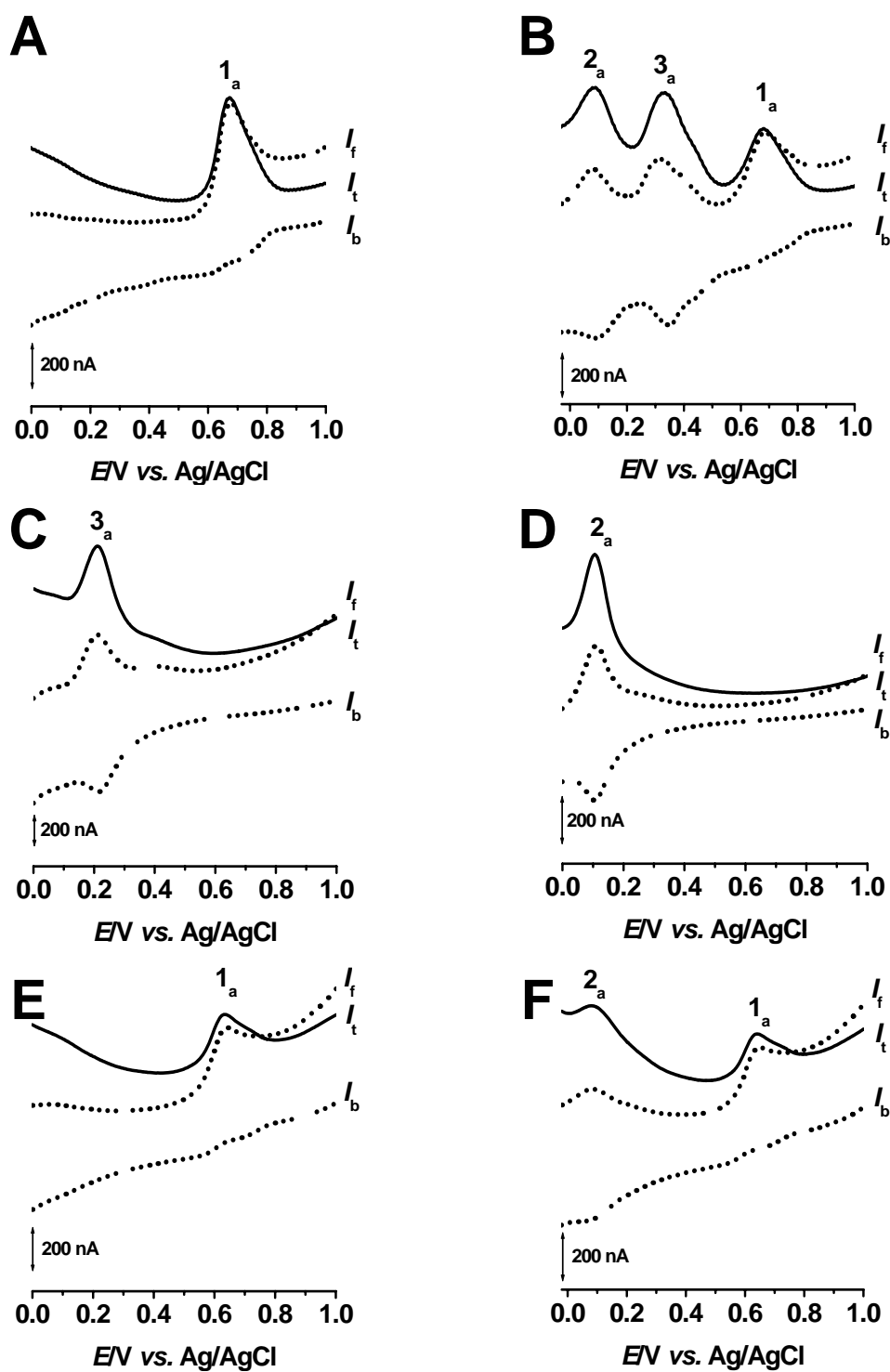


Figura 4.7 Voltamogramas de SW registrados em soluções em 0,1M tampão fosfato pH = 7,0, de 25 μ M de (A, B) fenol – (A) primeiro e (B) segundo varrimento; (C) catecol, (D) hidroquinona; e (E, F) resorcinol – (E) primeiro e (F) segundo varrimento.

$f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, $v_{\text{eff}} = 50$ mV s⁻¹, amplitude de pulso de 50 mV,

I_t – corrente totala, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Um segundo varrimento de SW registado na solução de fenol, sem limpar o GCE, mostrou a ocorrência de dois picos reversíveis, 2_a e 3_a , **Figura 4.7B**. Os valores idênticos de potencial e de corrente dos picos 2_a e 3_a , das curvas de corrente directa (I_f) e inversa (I_b) registadas na solução de fenol, indicavam que a transferência de carga é reversível. Os valores de potencial do pico 2_a foi idêntico ao da hidroquinona, **Figura 4.7C**, e do pico 3_a ao do catecol, **Figura 4.7D**, confirmando a formação de espécies de dihidroxibenzeno em posição *orto* e *para* durante da oxidação de fenol.

O primeiro voltamograma de SW registado numa solução de 25 μM de resorcinol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, mostrou um pico de oxidação irreversível 1_a . A oxidação ocorreu a um potencial de oxidação semelhante ao do fenol, $E_p = + 0,65 \text{ V}$, **Figura 4.7E**. No segundo voltamograma registado sem limpar o CGE, um novo pico 2_a ocorreu para potencial menos elevado, $E_p = + 0,08 \text{ V}$, correspondente à oxidação do produto de oxidação do resorcinol, **Figura 4.7F**. Este pico apresenta um valor de potencial idêntico à hidroquinona nas curvas de corrente directa e inversa, e corresponde a uma oxidação reversível.

4.3 DERIVADOS DO FENOL PARA-SUBSTITUÍDOS

O mecanismo de oxidação de 4-etilfenol e tiramina, compostos fenólicos *para*-substituídos, foi também investigado de modo a esclarecer o efeito do substituinte na posição *para* da molécula de fenol, **Figura 4.8**.

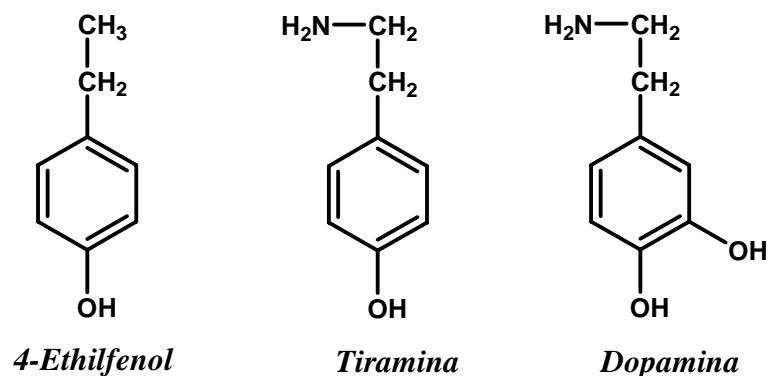


Figura 4.8 Estrutura química do 4-etilfenol, tiramina e dopamina.

Deste modo, foi estudado o comportamento electroquímico do 4-etilfenol e da tiramina na superfície de GCE, e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para a oxidação electroquímica da dopamina, o produto de hidroxilação da tiramina.

4.3.1 Voltametria de impulso diferencial

O comportamento electroquímico dos compostos 4-etilfenol, tiramina e dopamina foi estudado com o GCE, utilizando voltametria de DP em soluções do 25 μM em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 4.9**. Para cada solução foram registados dois voltamogramas sucessivos.

Os primeiros voltamogramas de DP registados entre 0,00 V e + 1,00 V, mostraram que os fenóis *para*-substituídos, 4-etilfenol e tiramina, apresentaram um único pico de oxidação 1_a. O potencial deste pico variava ligeiramente com o substituinte da posição C4, sendo semelhante ao potencial de oxidação do fenol, **Figuras 4.9A e 4.9B**.

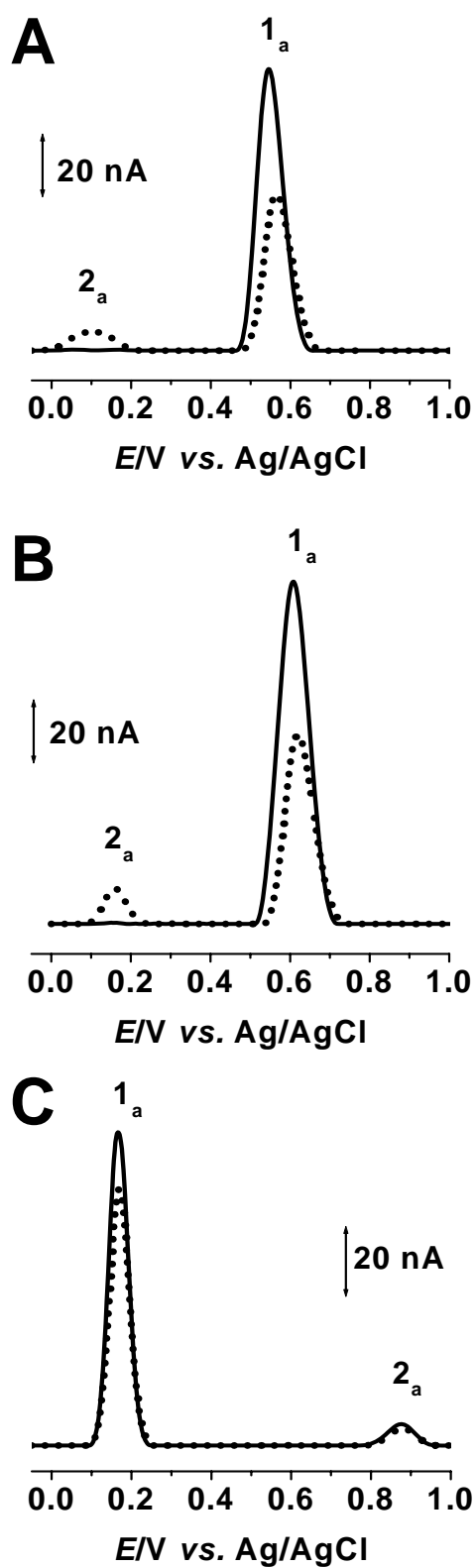


Figura 4.9 Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, registados em soluções em 0.1 M tampão fosfato pH = 7.0 de 25 μ M de: (A) 4-etilfenol, (B) tiramina e (C) dopamina; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

O primeiro varrimento de DP registado em solução de 25 μM de dopamina a $\text{pH} = 7,0$, mostrou dois picos consecutivos de oxidação, **Figura 4.9C**. O primeiro pico de oxidação, 1_a a $E_p = + 0,18\text{V}$, é atribuído à oxidação do grupo catecol da dopamina, o que leva à formação da dopamino-quinona.

O segundo pico de oxidação da dopamina, 2_a a $E_p = + 0,88\text{ V}$, corresponde à oxidação da espécie leucodopaminocromo, formada em soluções de electrólito de suporte com $\text{pH} > 5,0$, através de reacção de adição Michael [32].

No segundo varrimento de DP registado para as moléculas de 4-etilfenol e de tiramina, nas mesmas soluções e sem limpar o CGE, foi observado um novo pico de oxidação, 2_a , a um valor de potencial menos elevado, perto de valor do primeiro pico de oxidação da dopamina, 1_a . As pequenas diferenças nos valores de potencial de oxidação e de corrente observadas para cada um destes compostos devem-se à presença de substituintes diferentes na posição *para* da molécula de fenol, o que, no entanto, não altera o mecanismo de oxidação.

4.3.2 Voltametria de onda quadrada

O primeiro voltamograma de SW registado numa solução de 25 μM de tiramina em tampão 0,1 M fosfato $\text{pH} = 7,0$, **Figura 4.10A**, mostrou características semelhantes com as do fenol, um pico de oxidação irreversível a $E_p = + 0,62\text{ V}$. No segundo varrimento, apareceu o pico de oxidação 2_a a $E_p = + 0,20\text{ V}$, **Figura 4.10B**. As correntes e os potenciais das componentes directa e inversa da curva total, apresentaram valores semelhantes, confirmando a reversibilidade do pico 2_a do produto de oxidação da tiramina. As diferenças entre os produtos de oxidação do fenol e da tiramina são devidas ao facto de a posição *para* da tiramina estar ocupada.

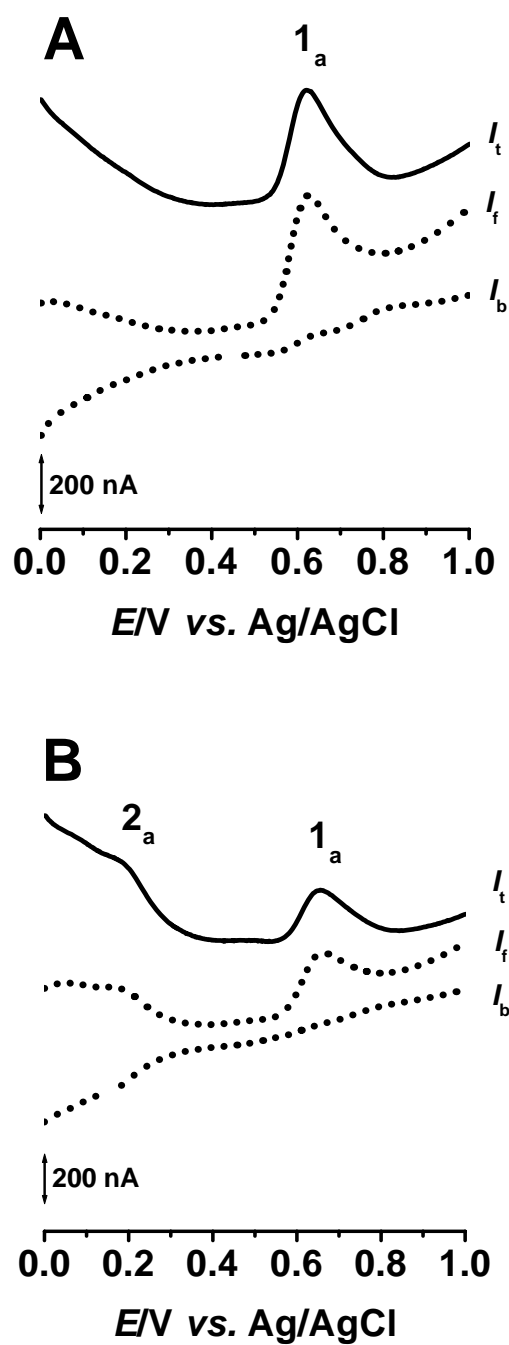


Figura 4.10 Voltamogramas de SW obtidos em soluções de $25 \mu\text{M}$ de tiramina em $0,1 \text{ M}$ tampão fosfato $\text{pH} = 7,0$; (A) primeiro e (B) segundo varrimento; $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV , I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

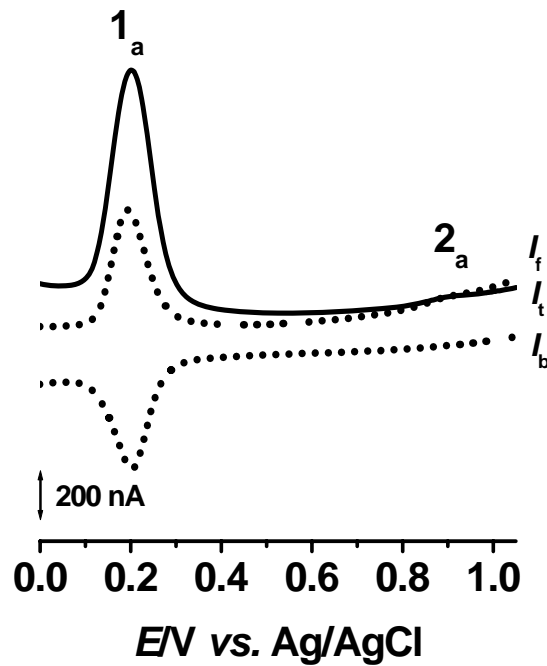


Figura 4.11 Voltamograma de SW, obtida na solução de 25 μM de dopamina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV, I_t – corrente totala, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

O voltamograma de SW registado em solução de 25 μM de dopamina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 4.11**, mostrou um pico reversível 1_a a $E_p = +0,20 \text{ V}$, correspondente à oxidação do grupo catecol para a quinona.

Os valores de potencial idênticos do pico reversível 2_a da tiramina e do pico 1_a da dopamina indicam que, após a oxidação, a tiramina é oxidada para uma catecol.

4.4 MECANISMOS DE OXIDAÇÃO

O processo de oxidação do fenol ocorre num único passo, com a transferência de um electrão e um protão, pico 1_a, com a formação dum radical fenóxido instável com três formas isoméricas, **Figura 4.12**.

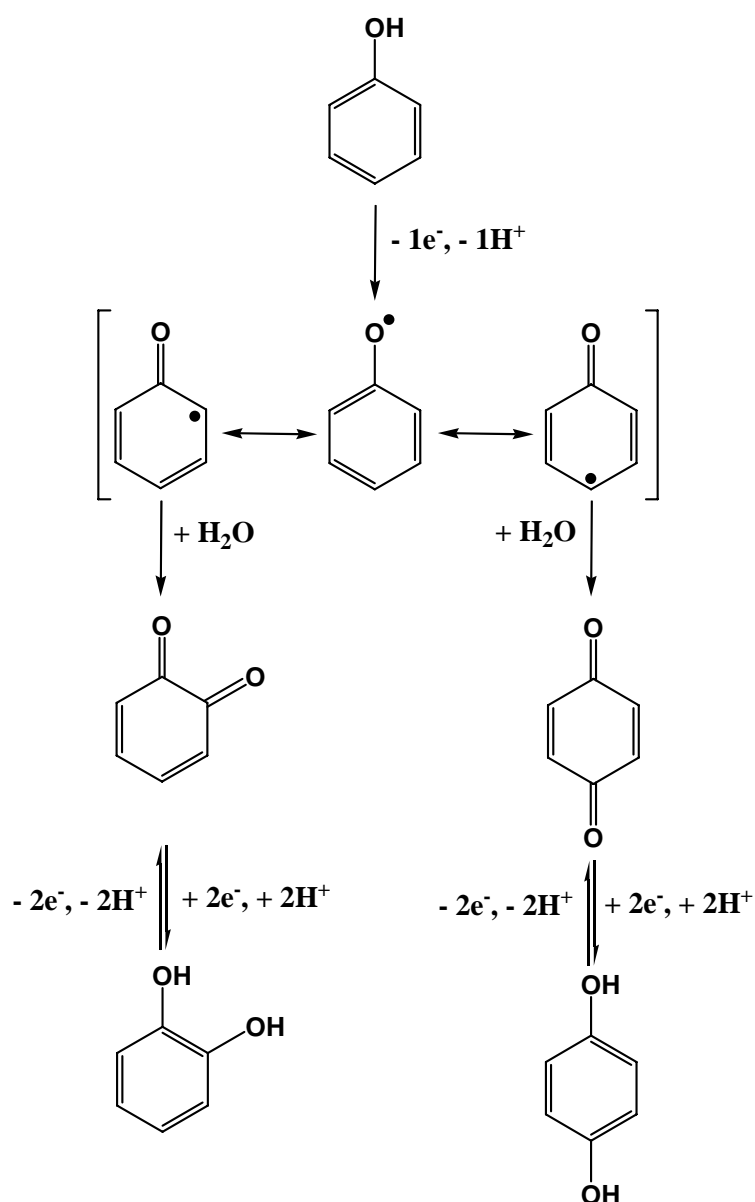


Figura 4.12 Esquema do mecanismo de oxidação do fenol proposto.

A maior densidade electrónica deste radical está localizada nas posições *orto* e *para*, sendo a posição *meta* não favorável para nenhum tipo de reacção química [23]. A estabilização deste radical, por ressonância, favorece a introdução de grupos hidróxilo nas posições *orto* ou *para* do anel e a formação de dois produtos que vão ser imediatamente oxidados devido ao elevado potencial aplicado no momento da oxidação do fenol. Os dois produtos de oxidação são reduzidos electroquimicamente de maneira reversível, num mecanismo redox que envolve a perda de dois electrões e dois protões, *orto*-quinona para catecol correspondente ao pico 3_c, e *para*-quinona para hidroquinona correspondente ao pico 2_c.

Tomando em consideração todos os dados apresentados, a oxidação electroquímica do fenol a GCE leva à formação de dois produtos de oxidação, hidroquinona e catecol, e pode ser proposto o mecanismo electroquímico-químico apresentado na **Figura 4.12**.

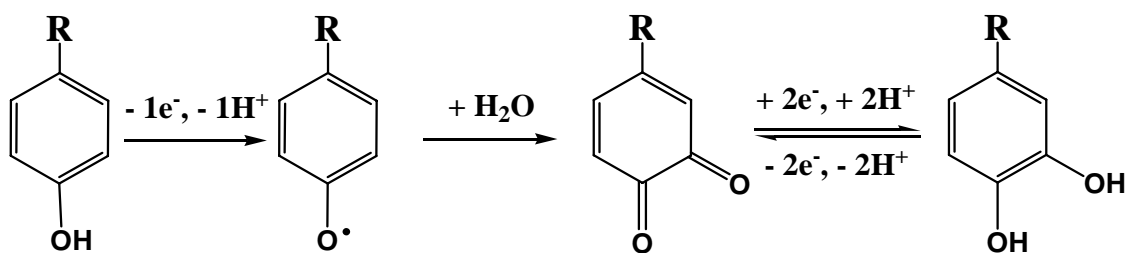


Figura 4.13 Esquema do mecanismo de oxidação dos fenóis *para*-substituídos proposto.

Semelhante ao mecanismo electroquímico-químico do fenol, o processo de oxidação dos fenóis *para*-substituídos estudados pode ser explicado também por um mecanismo electroquímico-químico, que envolve a oxidação para uma espécie catecol, uma vez que nos fenóis substituídos a posição *para* esta ocupada, **Figura 4.13**.

4.5 CONCLUSÕES

O comportamento anódico do fenol foi estudado utilizando um GCE e electrólitos de suporte de diferentes pHs. A oxidação electroquímica é irreversível e ocorre num único passo, com a transferência de um electrão e um protão. Os produtos de oxidação do fenol, a *orto*-quinona e a *para*-quinona são também oxidados de maneira reversível, através de um mecanismo dependente do pH.

A oxidação dos fenóis *para*-substituídos corresponde à oxidação do grupo fenol e os produtos resultantes adsorvem na superfície do eléctrodo, sendo posteriormente oxidados numa reacção reversível. Embora a oxidação dos fenóis *para*-substituídos ocorra num mecanismo semelhante ao do fenol, é formado um único produto de oxidação, ao contrário dos dois produtos de oxidação do fenol, devido à posição *para* estar ocupada por diferentes substituintes e a oxidação ocorrer apenas na posição *orto*, levando à formação duma espécie do tipo catecol.

Capítulo 5

Estudo voltamétrico do ácido acetilsalicílico e do triflusal

5.1 INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação dos compostos salicilatos ácido acetilsalicílico (ASA) e triflusal (TRF) e os seus metabolitos, ácido salicílico (SA) e ácido 2-hidróxi-4-(triflorometil) benzóico (HTB), **Figura 5.1**, foram investigados por voltametria de DP com os GCE e BDDE. Os processos de hidrólise do ASA e do TRF foram também estudados por espectrofotometria UV/Vis em soluções de diferente pHs [2].

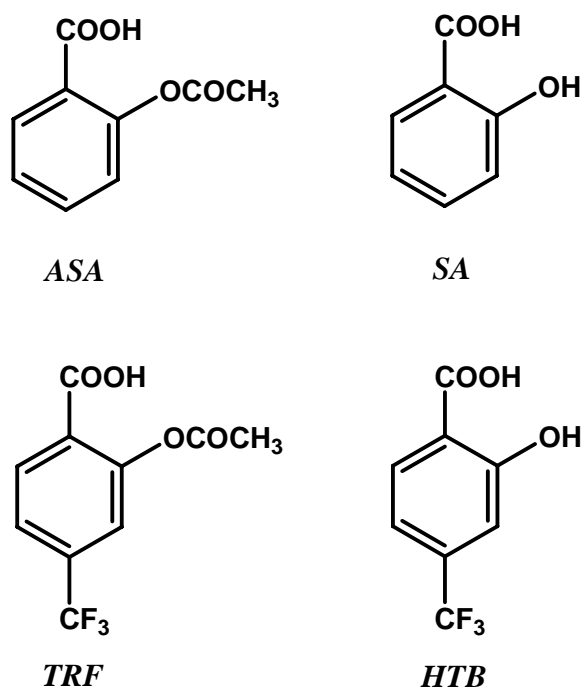


Figura 5.1 Estrutura química do TRF, ASA, HTB e SA.

Na superfície de GCE, a determinação electroquímica do ASA e do TRF só foi possível de maneira indirecta, através da detecção voltamétrica dos seus metabolitos, SA e HTB. No entanto, a janela mais larga de potencial do BDDE, permite a geração dos radicais OH^\bullet na sua superfície em meio aquoso, possibilitou o estudo voltamétrico do ASA e do TRF, através da interacção com os radicais, e dos seus metabolitos, SA e HTB [2].

A hidrólise de TRF e ASA leva à formação de HTB e SA, respectivamente. Por esta razão, antes de cada experiência foram sempre preparadas novas soluções. As experiências foram repetidas após 24 h, na mesma solução que foi armazenada a 4 °C. Entre a preparação de ASA 0h ou TRF 0h e as experiências, houve um intervalo de tempo de aproximadamente 10 min. As denominações utilizadas foram as seguintes: ASA 0h e TRF 0h para as soluções acabadas de preparar antes de cada experiência, e ASA 24h e TRF 24h para as soluções usadas após 24h de preparação.

5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV/VIS

Os espectros de UV obtidos em soluções acabadas de preparar de 200 μM de ASA e de TRF em água (ASA 0 h e TRF 0 h), mostraram que a ASA e o TRF apresentam a absorvância máxima para o mesmo comprimento de onda $\lambda = 269,5 \text{ nm}$, enquanto que a absorvância máxima dos seus produtos de hidrólise ocorre a $\lambda = 296,5 \text{ nm}$ para SA e a $\lambda = 308 \text{ nm}$ para HTB, **Figura 5.2A**.

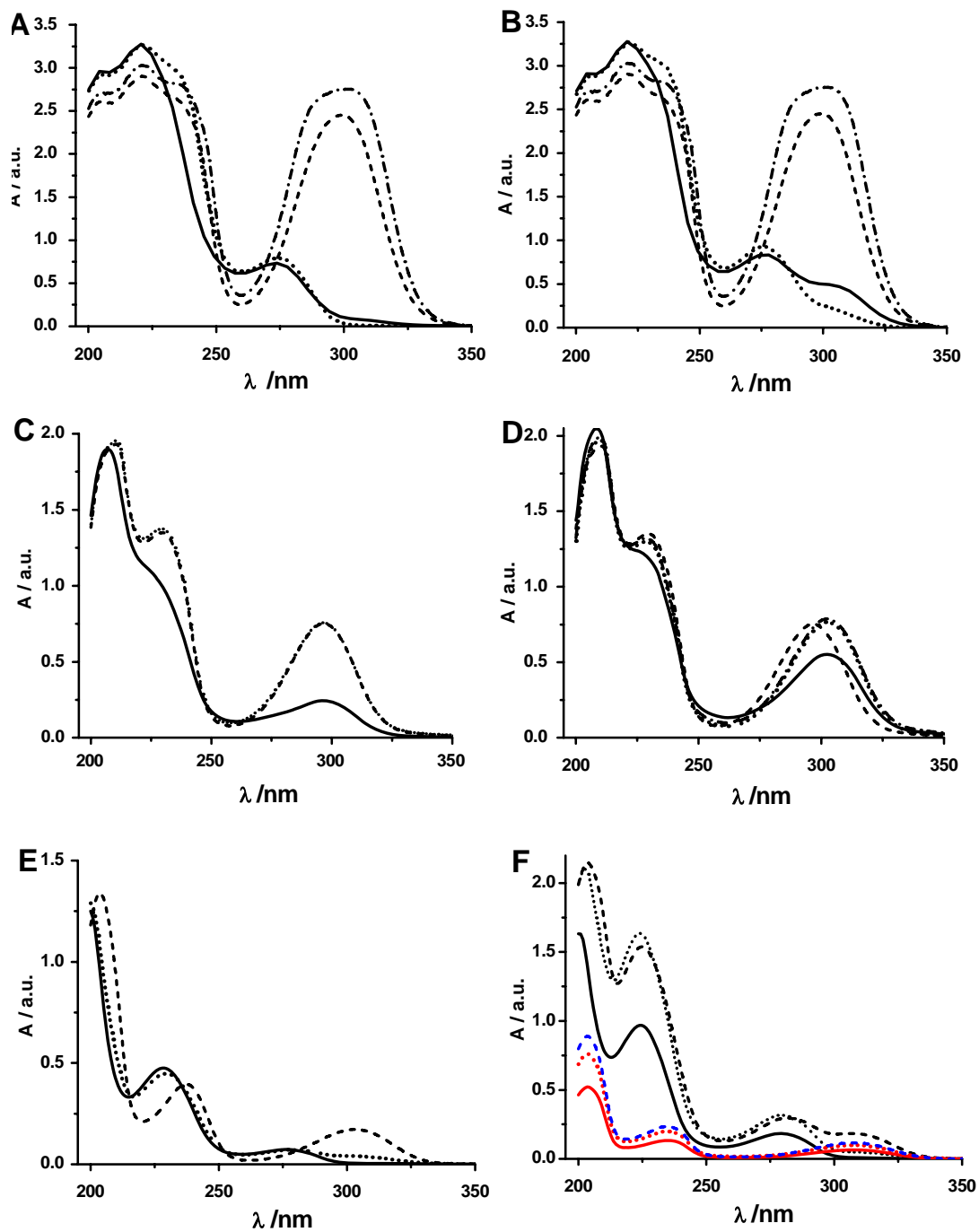


Figura 5.2 Espectros de UV/Vis, obtidos para soluções:

(A-B) em água de 200 μM:

(A) (—) TRF 0 h, (●●●) ASA 0 h, (---) SA 0 h e (-·-·-) HTB 0 h;

(B) (—) TRF 24 h, (●●●) ASA 24 h, (---) SA 24 h e (-·-·-) HTB 24 h;

(C-D) em 20 mM de NaOH de 200 μM:

(C) (—) ASA 0 h, (●●●) ASA 2 h e (---) SA;

(D) (—) TRF 0 h, (●●●) TRF 1 h, (---) SA e (-·-·-) HTB;

(E-F) em 10 mM de H₂SO₄ de 200 μM:

(E) (—) ASA 0 h, (●●●) ASA 24 h e (---) SA;

(F) (—) TRF 0 h, (●●●) TRF 2 h, (---) TRF 24 h,

(—) HTB 0 h, (●●●) HTB 2 h, e (-·-·-) HTB 24 h.

O espectro de UV da solução de ASA em água registado passado 24 h, apresentou, para além da sua absorvância máxima a $\lambda = 269,5$ nm, um pequeno ombro correspondente ao comprimento de onda do seu produto de hidrólise, SA, **Figura 5.2B**.

O espectro de UV do TRF após 24 h (TRF 24 h) apresentou duas bandas de absorção bem definidas, **Figura 5.2B**. A primeira banda estava localizada ao comprimento de onda $\lambda = 269,5$ nm, correspondente ao TRF, enquanto que a segunda, a $\lambda = 308$ nm, estava relacionada com a formação do seu produto de hidrólise HTB.

Os resultados obtidos em soluções preparadas em 20 mM de NaOH mostraram que a hidrólise do ASA e do TRF é muito mais rápida em meio alcalino do que em água. A hidrólise completa dos compostos foi observada após 2 h de incubação no caso de ASA e 1 h para TRF, **Figuras 5.2C e 5.2D**. Os espectros de UV da solução de ASA após 2 e 24 h, bem como os de SA após 0, 1, 2 e 24 h de incubação foram semelhantes.

A hidrólise do ASA e do TRF foi muito mais lenta para as soluções preparadas em 10 mM H₂SO₄. Após 24 h de incubação, os espectros de UV de ASA e de TRF apresentaram apenas um pequeno ombro correspondente a SA para $\lambda = 296,5$ nm, **Figura 5.2E**, e HTB para $\lambda = 308$ nm, **Figura 5.2F**.

Estes resultados mostraram que a hidrólise do ASA e do TRF é dependente do pH da solução, sendo muito rápida no intervalo de pH 11,0 – 12,0 e lenta no intervalo de pH 4,0 – 8,0. A estabilidade máxima das moléculas é atingida para pH ácido.

5.3 VOLTAMETRIA

O comportamento electroquímico e os mecanismos de oxidação de ASA, TRF e dos seus metabolitos, SA e HTB, foram investigados na superfície dos GCE e BDDE.

5.3.1 Eléctrodo de carbono vítreo

A oxidação electroquímica das moléculas de ASA, SA, TRF e HTB foi investigada no GCE usando voltametria de DP, num intervalo de pH entre 1 e 8. As soluções de 10 mM ASA, TRF, SA ou HTB foram preparadas em água e foram utilizadas após vários tempos de incubação. A partir destas soluções foram preparadas soluções de 1 mM de ASA e de TRF e de 0,1 mM de SA e de HTB, em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH e força iónica de 0,1 M, que foram investigadas por voltametria de DP.

Para uma solução acabada de preparar de ASA (ASA 0 h) não foi observado nenhum pico de oxidação, mesmo para concentrações elevadas. Após 24 h de incubação (ASA 24 h) foi observada a ocorrência dum pequeno pico de oxidação, **Figuras 5.3A**.

A hidrólise do ASA em água dá origem ao SA. Por esta razão a oxidação do SA foi investigada, **Figura 5.3A**, e mostrou a ocorrência dum pico de oxidação, P_{SA} , ao mesmo valor de potencial que o pico do ASA 24 h. Como o ASA não é electroactivo no GCE, o pico de oxidação do ASA 24 h corresponde à oxidação do produto da hidrólise do ASA, o SA, sendo este pico denominado também P_{SA} . Estes resultados mostram que, na superfície de GCE, a determinação electroquímica do ASA pode ser realizada apenas de maneira indirecta, após a hidrólise total de ASA em SA.

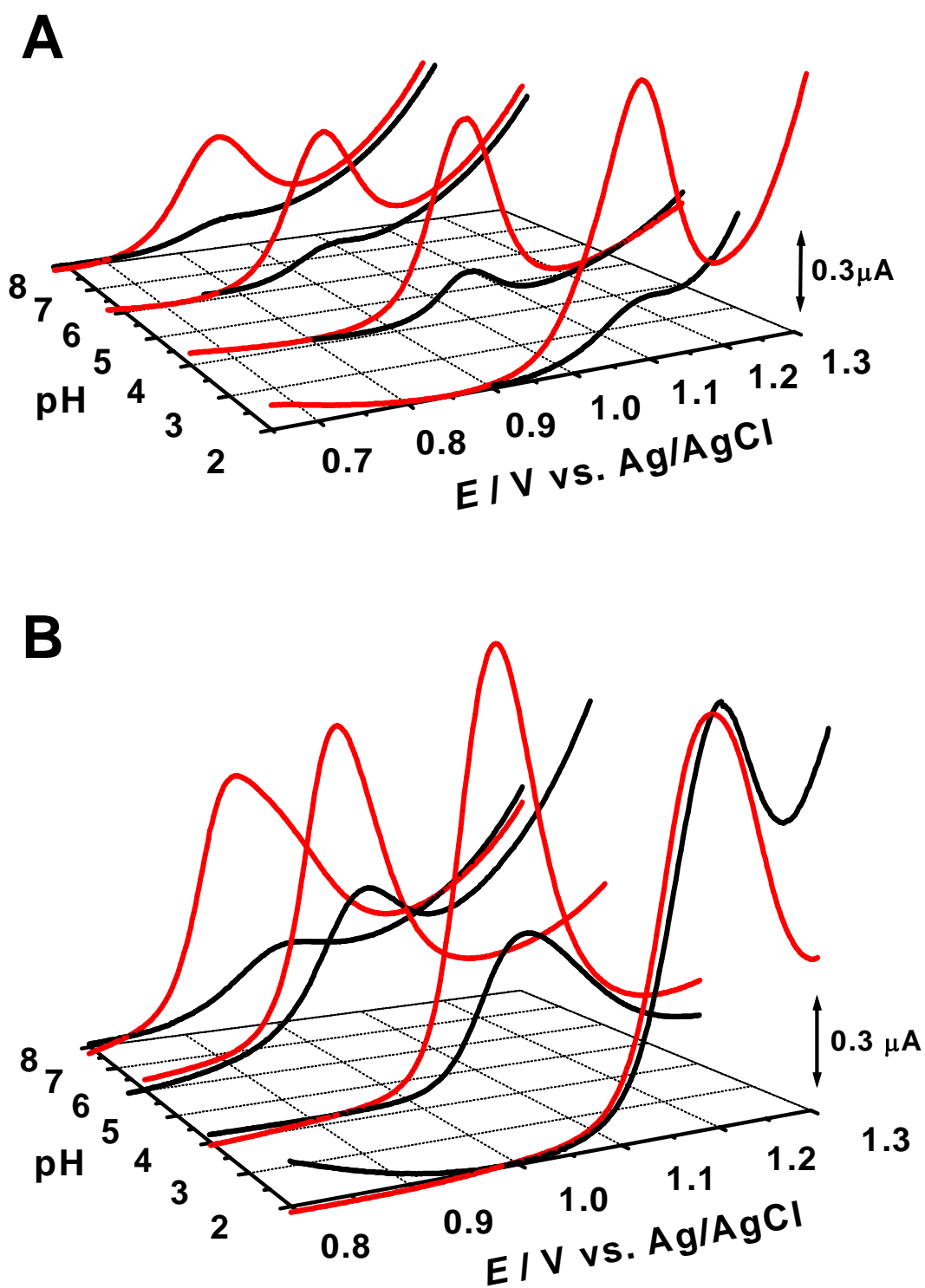


Figura 5.3 Voltamogramas de DP obtidos a GCE em soluções em eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH de: (A) (—) ASA 24 h e (—) SA, e (B) (—) TRF 24 h e (—) HTB.

Os voltamogramas de DP registados para soluções acabadas de preparar de TRF (TRF 0 h) também não mostraram nenhum pico de oxidação. Contudo, após 24 h de incubação (TRF 24 h) foi observado um pico de oxidação, **Figura 5.3B**, cuja corrente era superior à corrente do pico do ASA 24 h, **Figura 5.3A**. Uma vez que a hidrólise do TRF em água dá origem a HTB, a oxidação do HTB foi também investigada na superfície do GCE, **Figura 5.3B**. O pico de oxidação de HTB obtido nestas condições, P_{HTB} , ocorreu no mesmo potencial do pico de oxidação do TRF 24 h. Uma vez que o TRF não é electroactivo na janela de potencial estudada, o pico de oxidação do TRF 24 h corresponde à oxidação do produto da hidrólise do TRF, o HTB, sendo este pico denominado P_{HTB} .

A oxidação do SA e do HTB no GCE segue um comportamento semelhante mas com pequenas diferenças nos potenciais de oxidação, **Figuras 5.3 e 5.4**. Este facto deve-se a presença de grupo CF_3 na molécula de HTB, que induz um efeito estérico dificultando a sua oxidação.

O comportamento de SA e do HTB para diferentes valores de pH foi investigado, **Figuras 5.3 e 5.4**. Para os dois picos, P_{SA} e P_{HTB} , no intervalo $1,0 < \text{pH} < 3,0$ a inclinação da recta observada foi de 61 mV por unidade de pH, enquanto que para $3,0 < \text{pH} < 7,0$ a inclinação da recta foi de 29 mV por unidade de pH. Para $\text{pH} > 7,0$, os potenciais dos picos de oxidação foram independentes do pH.

A variação de 61 mV por unidade de pH indica que a oxidação do SA e do HTB nos electrólitos de suporte com $\text{pH} < 3$ envolve o mesmo número de electrões e de protões. Além disso, nestes electrólitos, a largura a meia altura encontrada para os dois picos, P_{SA} e P_{HTB} , $W_{1/2} \sim 90$ mV, foi próximo de valor teórico, correspondente a uma reacção electroquímica envolvendo a transferência de um electrão [238].

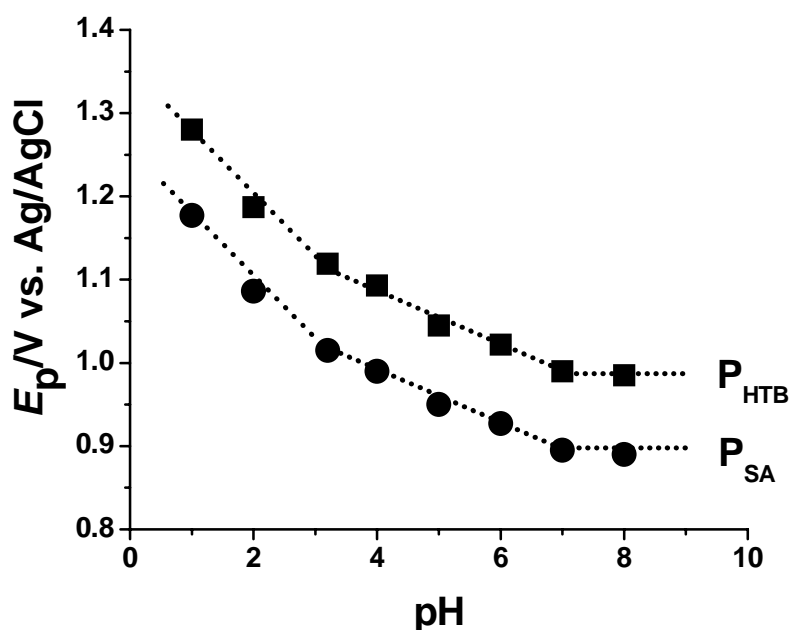


Figura 5.4 Gráfico da variação com o pH do (■) E_p do pico P_{SA} e do (●) E_p do pico P_{HTB} .

O comportamento de SA e do HTB para diferentes valores de pH foi investigado, **Figuras 5.3 e 5.4**. Para os dois picos, P_{SA} e P_{HTB} , no intervalo $1,0 < \text{pH} < 3,0$ a inclinação da recta observada foi de 61 mV por unidade de pH, enquanto que para $3,0 < \text{pH} < 7,0$ a inclinação da recta foi de 29 mV por unidade de pH. Para $\text{pH} > 7,0$, os potenciais dos picos de oxidação foram independentes do pH.

A variação de 61 mV por unidade de pH indica que a oxidação do SA e do HTB nos electrólitos de suporte com $\text{pH} < 3,0$ envolve o mesmo número de electrões e de prótons. Além disso, nestes electrólitos, a largura a meia altura $W_{1/2} \sim 90$ mV encontrada para os dois picos, P_{SA} e P_{HTB} , corresponde a uma reacção electroquímica envolvendo a transferência de um electrão [238].

Deste modo, é possível concluir que, para pH inferior a 3,0, a reacção de oxidação do SA e do HTB na superfície do GCE ocorre com a transferência de um electrão e um próton. O ponto de inflexão a cerca de pH 3,0 corresponde ao primeiro

pK_a do SA e HTB. Tendo em consideração os resultados obtidos para os compostos fenólicos, *Capítulo 4*, a oxidação do SA e do HTB pode ser explicada num mecanismo complexo do tipo electroquímico-químico.

A inclinação das rectas de 29 mV por unidade de pH para $3,0 < \text{pH} < 7,0$ indica que o número de prótons envolvidos no mecanismo de oxidação é metade do número de electrões transferidos. Esta mudança no mecanismo de oxidação é explicada por duas reacções de transferência de electrão consecutivas que ocorrem a potenciais muito próximos, sendo detectado apenas um pico de oxidação, que representa a convolução dos dois processos oxidativos. A primeira oxidação leva à formação dum radical que, após uma reacção química rápida em que perde o protão do grupo hidróxilo forma um produto intermediário que é imediatamente oxidado.

Para $\text{pH} > 7,0$, os potenciais dos picos P_{SA} e P_{HTB} são independentes do pH, a reacção envolvendo apenas a transferência de electrões.

Soluções de 10 mM de ASA e TRF foram preparadas em 20 mM de NaOH, de modo a acelerar a hidrólise para SA e HTB. A partir destas soluções de ASA e TRF hidrolisadas foram preparadas soluções em 0,1 M de H_2SO_4 com a concentração equivalente a 200 μM ASA e TRF e os voltamogramas de DP registados imediatamente com o GCE (ASA-hidrólise 0 h e TRF-hidrólise 0 h).

Os voltamogramas de DP com o GCE, **Figura 5.5**, mostram a ocorrência de picos de oxidação bem definidos, quando comparados com os voltamogramas de DP obtidos a partir de soluções preparadas em água onde não foi observada a ocorrência de nenhum pico. O electrólito de suporte 0,1 M de H_2SO_4 foi escolhido, uma vez que neste meio a oxidação de todos os compostos apresentava valores de corrente mais elevados.

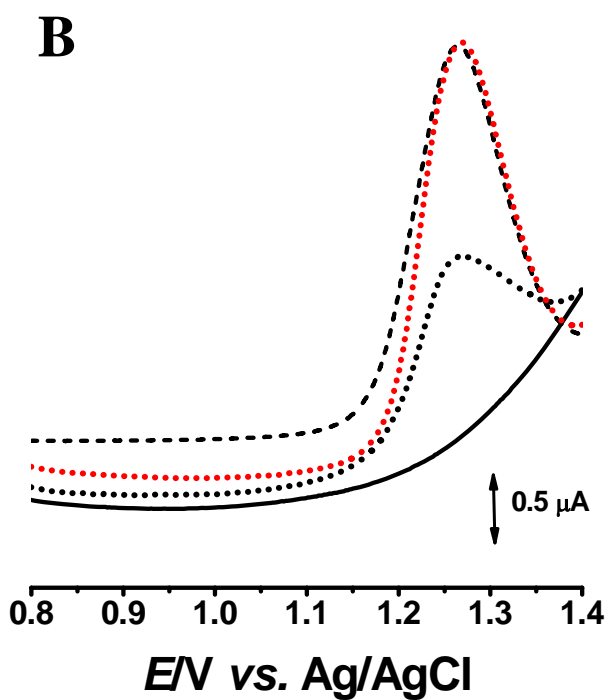
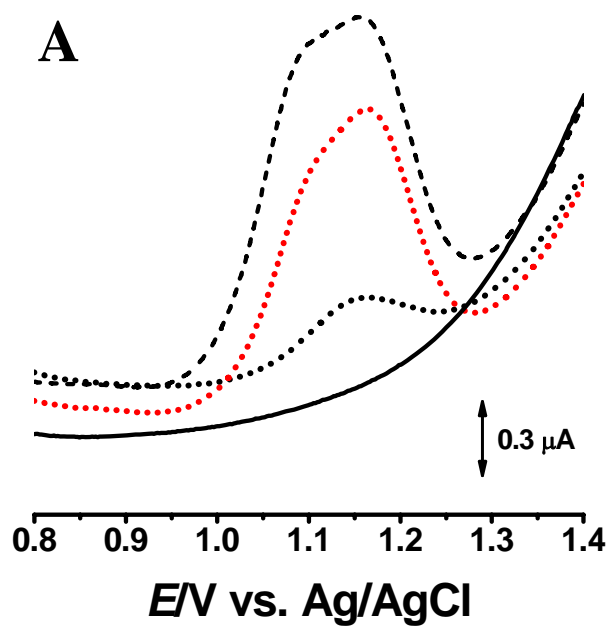


Figura 5.5 Voltamogramas de DP, obtidos com o GCE em

(—) 0,1 M H₂SO₄ em soluções de 200 μM: (A) (•••) ASA-hidrólise 0 h, (•••) ASA-hidrólise 2 h e (---) SA e (B) (•••) TRF-hidrólise 0 h, (•••) TRF-hidrólise 1 h e (---) HTB.

As correntes dos picos aumentaram com o tempo de incubação e após de 2 h de incubação a corrente do pico de oxidação do ASA 2 h ficou igual à corrente do pico de oxidação do SA, **Figura 5.5A**, o que confirma que após 2 h de incubação a hidrólise do ASA é total e que a espécie electroactiva presente na solução de ASA 2 h é o SA, o produto de hidrólise do ASA. A hidrólise total do TRF para HTB, ocorreu após apenas 1 hora, como está mostrado no voltamograma de DP obtido na solução de HTB, **Figura 5.5B**.

5.3.2 Eléctrodo de diamante dopado com boro

O comportamento electroquímico do ASA, do TRF e dos seus produtos de hidrólise, SA e HTB, foi investigado no BDDE, utilizando o mesmo procedimento experimental com o GCE. As soluções de 10 mM ASA, TRF, SA ou HTB foram preparadas em água. Os voltamogramas de DP foram registados em soluções acabadas de preparar de 0,1 mM de ASA, TRF, SA e HTB, em electrólitos com força iónica de 0,1 M e com valores de pH entre 1,0 e 7,0, a partir das soluções em água.

Os voltamogramas obtidos para ASA 0 h, **Figura 5.6A**, mostraram a ocorrência dum pico de oxidação a um potencial mais elevado do que o pico de oxidação do SA, **Figura 5.6B**.

Nos voltamogramas de DP registados nas soluções de SA, e para todas as soluções de electrólitos de suporte estudadas, foi observado um pico de oxidação P_{SA} correspondente à oxidação do SA, **Figura 5.6B**.

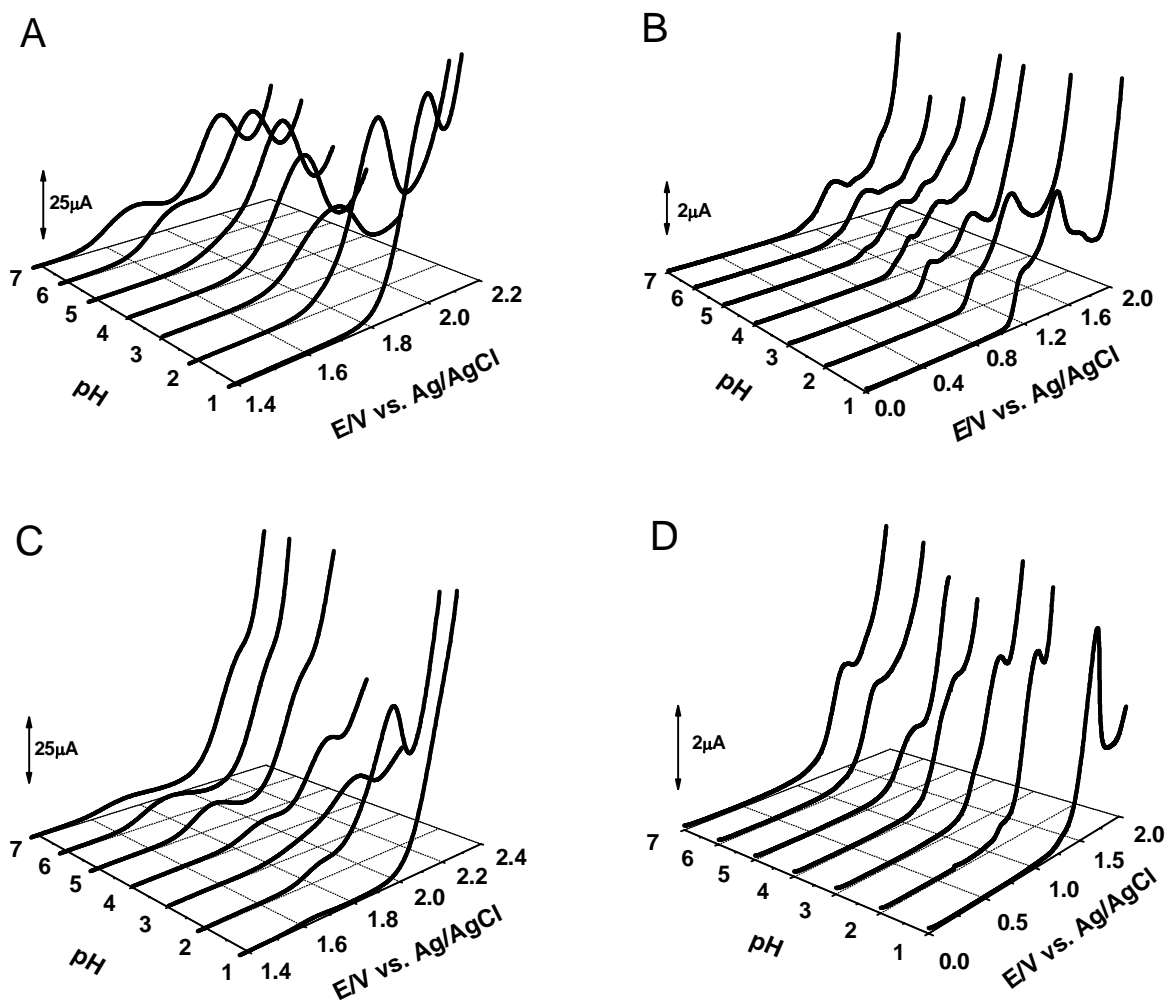


Figura 5.6 Voltamogramas de DP, obtidos com o BDDE em soluções preparadas em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH de 100 μM:
 (A) ASA 0 h; (B) SA; (C) TRF 0 h; (D) HTB.

O pico P_{SA} corresponde a formação do 2,3-DHBA (ácido 2,3-dihidroxi benzóico) e do 2,5-DHBA (ácido 2,5-dihidroxi benzóico), num processo de hidrólise química do SA induzida pelos radicais hidróxilo gerados na superfície do BDDE, **Figura 5.7.**

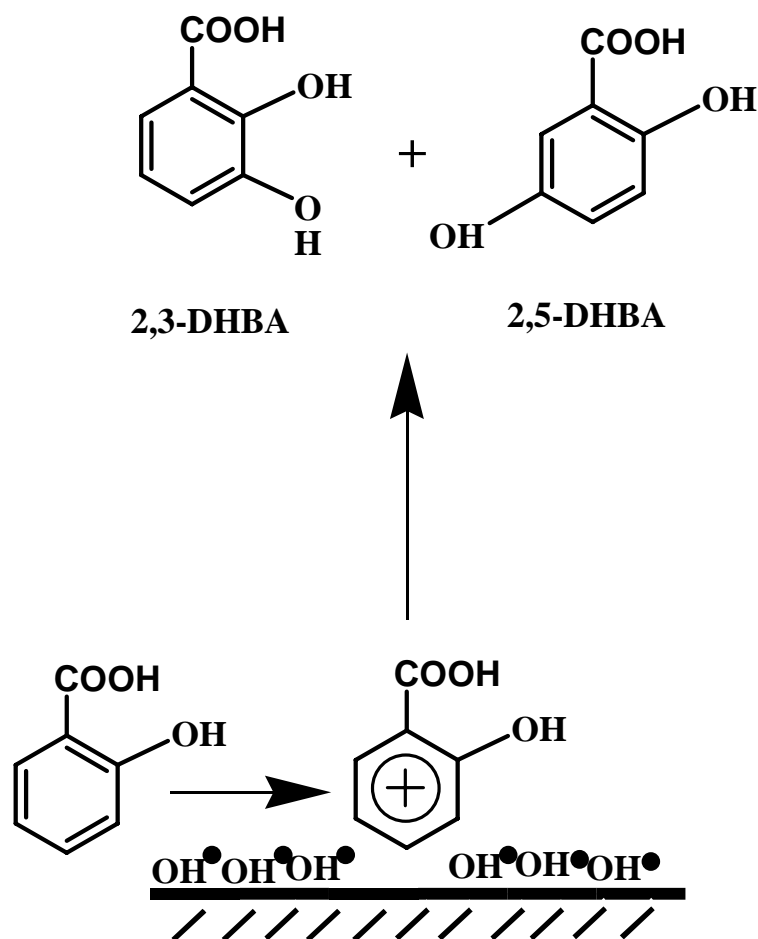


Figura 5.7 Mecanismo proposto para a hidroxilação do SA induzida pelos radicais hidróxilo electroquimicamente gerados na superfície do BDDE e formação de 2,3-DHBA e 2,5-DHBA.

O comportamento electroquímico do TRF 0 h na superfície do BDDE é semelhante ao observado para o ASA 0 h, no entanto o potencial do pico de oxidação do TRF 0 h, $E_{pa} = +2,10V$, está deslocado ~ 200 mV para um valor mais positivo do que o potencial de oxidação do ASA 0 h, **Figura 5.6C**. A corrente do pico de oxidação do TRF 0 h diminui com o aumento do pH do electrólito de suporte, desaparecendo em soluções alcalinas com $pH > 8,0$, o que mostra que nestas condições o TRF não é oxidável.

Por outro lado, o pico de oxidação do HTB ocorre a um potencial menor do que TRF 0 h. O potencial do pico de oxidação do HTB, P_{HTB} , foi deslocado ~ 200 mV para um valor mais positivo do que P_{SA} , **Figura 5.6D**. Este deslocamento do potencial dos picos de oxidação dos TRF e HTB para valores mais positivos de potencial, quando comparado com os potenciais dos picos de oxidação de ASA e SA, deve-se à existência do grupo CF_3 no anel aromático destas moléculas.

Para acelerar o processo de hidrólise, soluções de 10 mM de ASA e TRF foram preparadas em 20 mM de NaOH. A partir destas soluções de ASA e TRF hidrolisadas foram preparadas soluções em 0,1 M de H_2SO_4 com a concentração equivalente a 200 μM ASA e TRF e os voltamogramas de DP registados imediatamente com o BDDE (ASA-hidrólise 0 h e TRF-hidrólise 0 h), **Figura 5.8A**.

Os voltamogramas registados com o BDDE em 0,1 M H_2SO_4 , **Figura 5.8A**, mostraram o pico de oxidação do ASA, e também a ocorrência dum novo pico de oxidação bem definido correspondente a oxidação do seu produto de hidrólise, o SA. Devido à hidrólise rápida do ASA no meio alcalino, os voltamogramas de DP registados após 2 h mostraram apenas o pico de oxidação do SA.

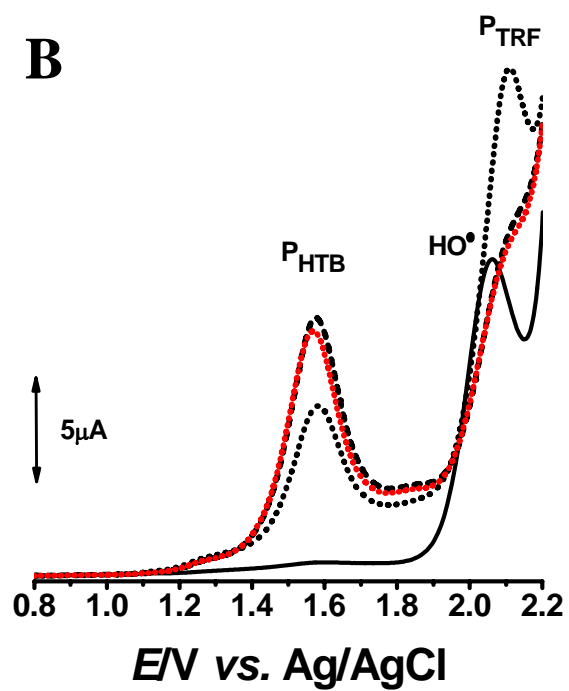
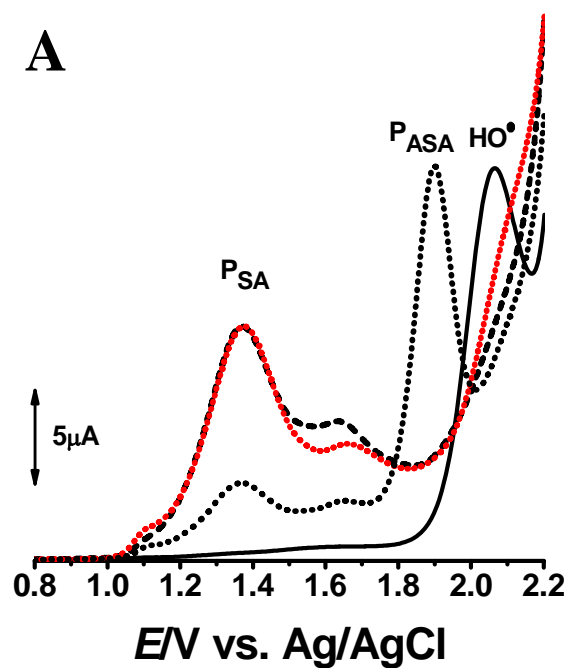


Figura 5.8 Voltamogramas de DP, obtidos com o BDDE em (—) 0,1 M H₂SO₄ em soluções de 200 μ M: (A) (•••) ASA-hidrólise 0 h, (•••) ASA-hidrólise 2 h e (---) SA e (B) (•••) TRF-hidrólise 0 h, (•••) TRF-hidrólise 1 h e (---) HTB.

As experiências efectuadas em soluções de TRF mostraram um processo de oxidação semelhante ao ASA, **Figura 5.8B**. Nos voltamogramas de DP registados numa solução de 200 μM TRF 0 h ocorreram dois picos de oxidação correspondentes a TRF e ao seu produto de hidrólise, HTB. Os voltamogramas registadas numa solução de TRF 1 h mostraram apenas o pico de oxidação do HTB, uma vez que em apenas 1 hora o TRF fica completamente hidrolisado.

5.4 CONCLUSÕES

O comportamento electroquímico do ASA e do TRF, antes e depois da hidrólise em água e em meio alcalino, foi investigado por voltametria de DP numa ampla gama de pH, utilizando o GCE e o BDDE.

As experiências de espectrofotometria de UV/Vis mostraram que em soluções de NaOH a hidrólise completa do ASA para SA ocorre em 2 horas, e do TRF para HTB, em 1 hora. Tanto o ASA como o TRF apresentaram absorvâncias máximas para o mesmo comprimento de onda, enquanto que o SA e HTB apresentaram o dois máximos da absorvância.

No GCE foi apenas possível a determinação indirecta do ASA e do TRF, através da investigação electroquímica dos seus produtos de hidrólise, SA e HTB. A oxidação do SA e do HTB ocorre em $\text{pH} < 3,0$ com a transferência de um electrão e um protão, enquanto que, para $3,0 < \text{pH} < 7,0$, a oxidação segue um mecanismo envolvendo dois electrões e apenas um protão.

Devido às suas propriedades, o BDDE possibilitou a determinação electroquímica directa dos ASA e TRF. Devido à existência do grupo CF_3 no anel

aromático, os potenciais de oxidação do TRF e do seu metabólito, HTB, ocorrem para potenciais superiores aos do ASA e SA, mas os mecanismos de oxidação são semelhantes aos do ASA e do SA. Para todos os valores de pH estudados, os picos de oxidação do TRF e do HTB ocorreram sempre deslocados ~ 200 mV para valores mais positivos de potencial, quando comparados com os potenciais dos picos de oxidação dos ASA e SA.

Capítulo 6

Estudo voltamétrico de compostos indólicos

6.1 INTRODUÇÃO

Os derivados de indol, **Figura 6.1**, são compostos biológicos presentes em microrganismos, plantas e animais, que desempenham um papel fundamental em farmacologia e nos diagnósticos clínicos e microbiológicos. O seu uso extenso nas áreas da química médica deve-se principalmente as suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas e anti-HIV [61-72].

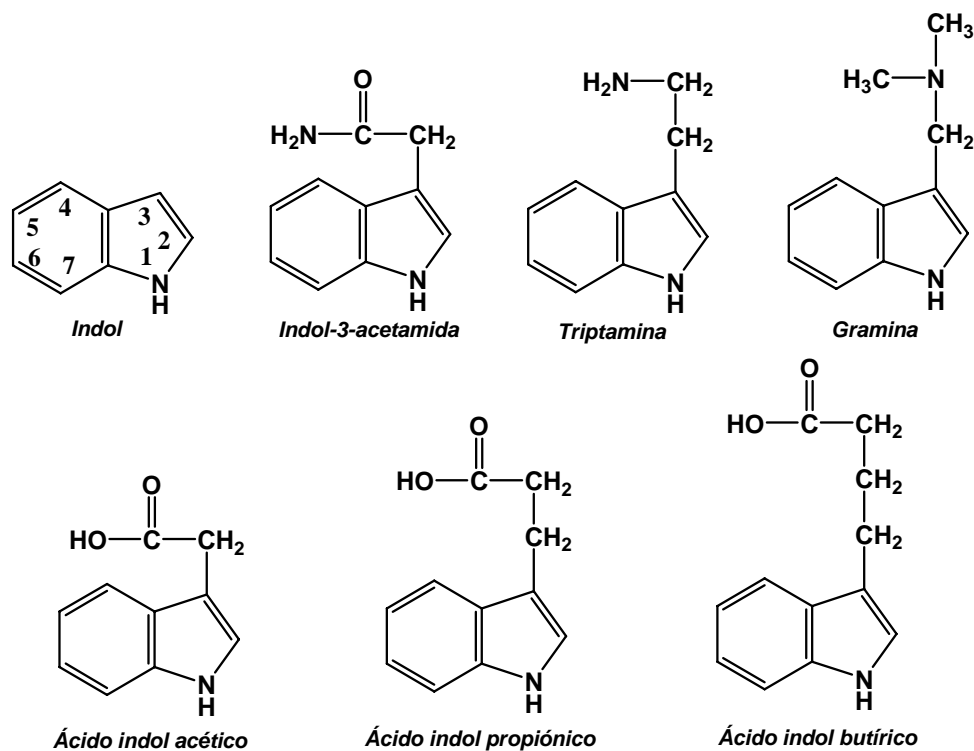


Figura 6.1 Estrutura química de compostos indólicos.

Os estudos da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) destes compostos mostraram que o grupo indol é o centro reactivo das moléculas derivadas do indol [59, 61, 72, 78].

Neste contexto, neste capítulo é apresentado um estudo detalhado do comportamento electroquímico do indol e o seu mecanismo de oxidação foi proposto. O mecanismo de oxidação de derivados do indol é influenciado pela existência de um grupo substituinte no carbono C3, e os processos de transferência de carga foram investigados [3].

6.2 INDOL

O primeiro voltamograma de DP registado numa solução de 25 μ M de indol (I) em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, na superfície limpa de GCE, **Figura 6.2**, mostrou a ocorrência do pico P^1_I , ao potencial $E_p = + 0,76$ V. No segundo voltamograma ocorreram novos picos de oxidação a potenciais menos elevados, P^2_I a $E_p = + 0,08$ V e P^3_I a $E_p = + 0,34$ V. Além disso, foi observado um decréscimo da corrente do pico de oxidação de indol, P^1_I , devido à adsorção dos produtos de oxidação que origina uma diminuição da área electroactiva do eléctrodo.

O efeito do pH sobre o mecanismo de oxidação do indol foi estudado por voltametria de DP utilizando o GCE, em diferentes soluções de electrólito de suporte de diferente pH. Os primeiros varrimentos de DP, registados em soluções de 25 μ M de indol, mostraram que a oxidação do indol ocorreu num único passo, **Figura 6.3A**, e o pico de oxidação apresentou um máximo de corrente em electrólito de suporte com pH neutro, **Figura 6.3B**.

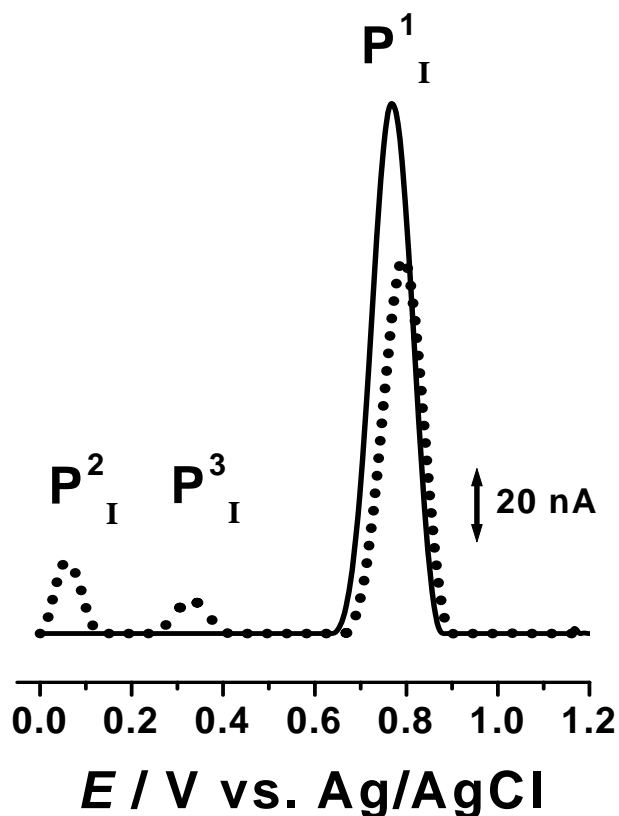


Figura 6.2 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos numa solução de 25 μM de indol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (●●●) segundo varrimento.

Para $\text{pH} < 3,3$, a oxidação do indol é independente do pH, e o pico de oxidação P_1^1 ocorreu a $E_p = + 0,95 \text{ V}$. Para estas soluções de electrólito de suporte, o valor da largura a meia altura do pico de oxidação de indol é $W_{1/2} \sim 100 \text{ mV}$, próximo do valor teórico de 90 mV, o que corresponde a uma reacção electroquímica envolvendo a transferência de um electrão.

Para soluções de electrólito de suporte com $\text{pH} > 3,3$, o potencial de oxidação do pico do indol foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, seguindo a relação $E_p (\text{V}) = 1,130 - 0,060 \text{ pH}$.

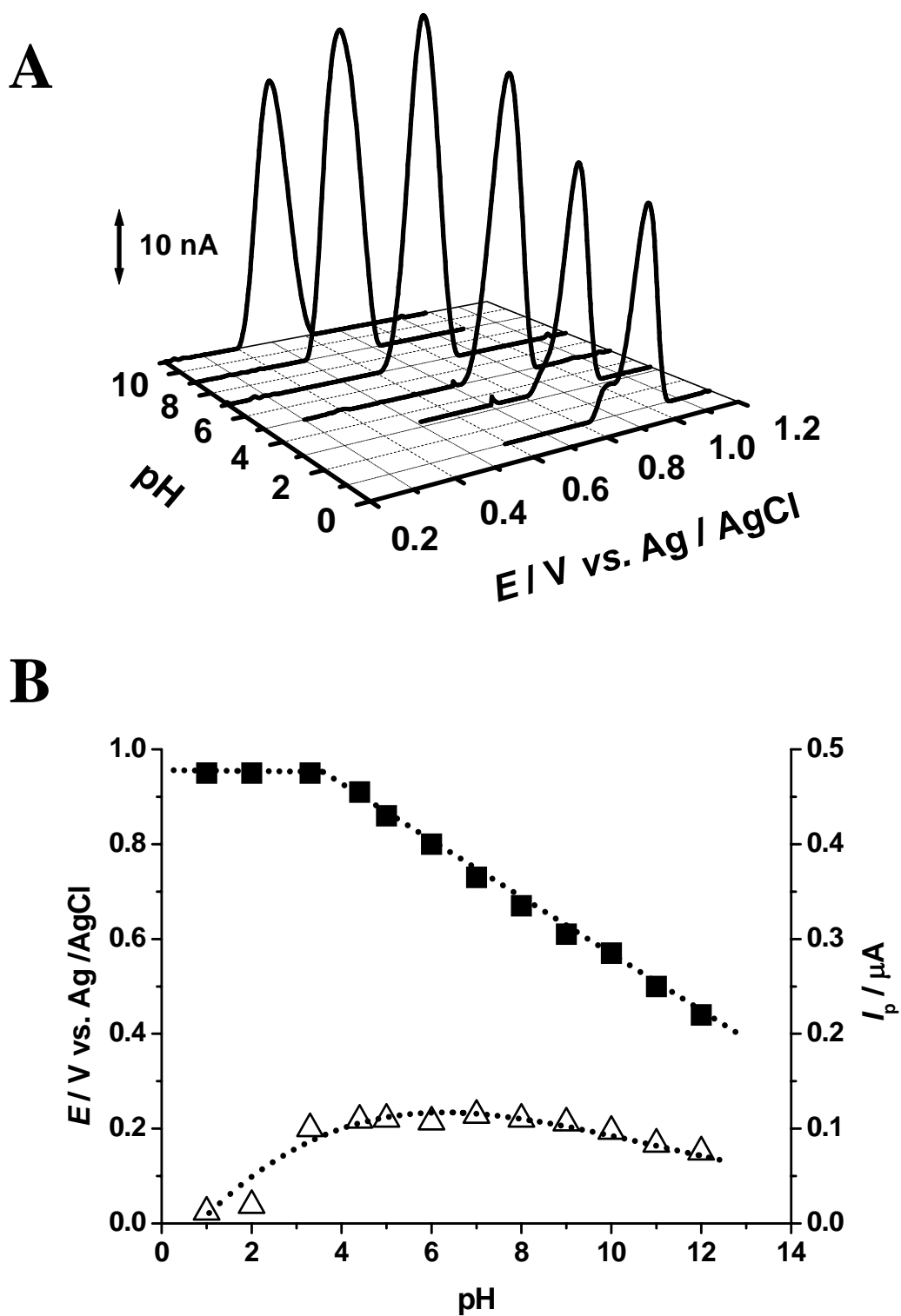


Figura 6.3 (A) Primeiro voltamograma de DP com correcção de linha de base obtidos em soluções de 25 μM de indol em soluções de electrólito de suporte com diferentes valores de pH.

(B) Gráfico da variação com pH do (■) E_p^1 e da (○) I_p^1 do pico P_1 .

A inclinação da recta de 60 mV por unidade de pH, **Figura 6.3B**, mostra que a oxidação do indol envolve o mesmo número de electrões e de protões. Como a largura a meia altura do pico de oxidação de indol foi $W_{1/2} \sim 100$ mV, no intervalo $3,3 < \text{pH} < 12,0$, a oxidação de indol ocorre com a transferência de um electrão e um protão.

As reacções de transferência de carga correspondentes à oxidação dos produtos de indol foram também estudadas por voltametria de DP, **Figura 6.4**.

Os voltamogramas segundos de DP foram registados nas mesmas condições que o primeiro voltamograma e sem limpar a superfície de eléctrodo. Os novos picos P^2_I e P^3_I foram observados para todas as soluções de electrólito de suporte.

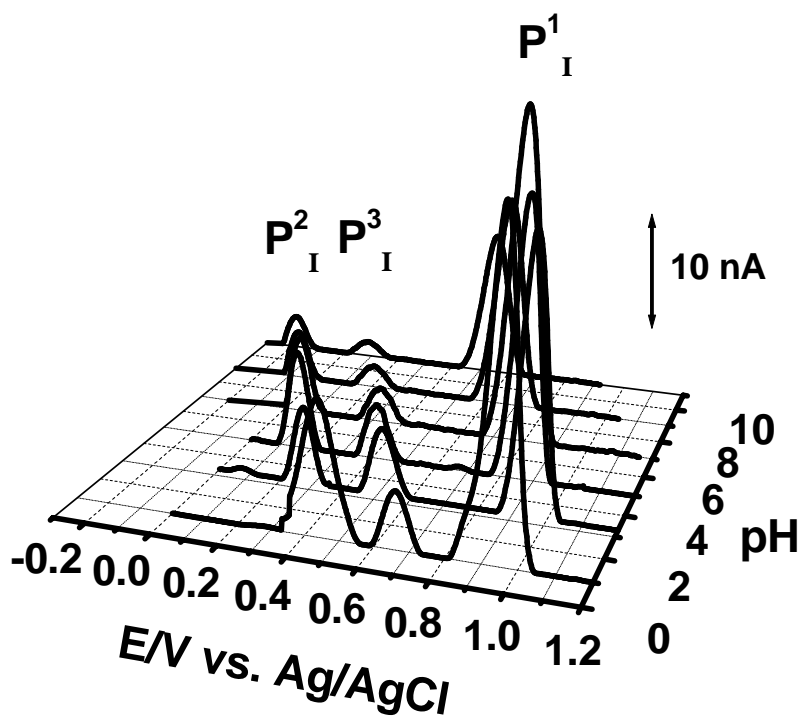


Figura 6.4 Segundo voltamograma de DP com correcção de linha de base, obtido nas soluções de 25 μM de indol em soluções de electrólito suporte com diferentes valores de pH.

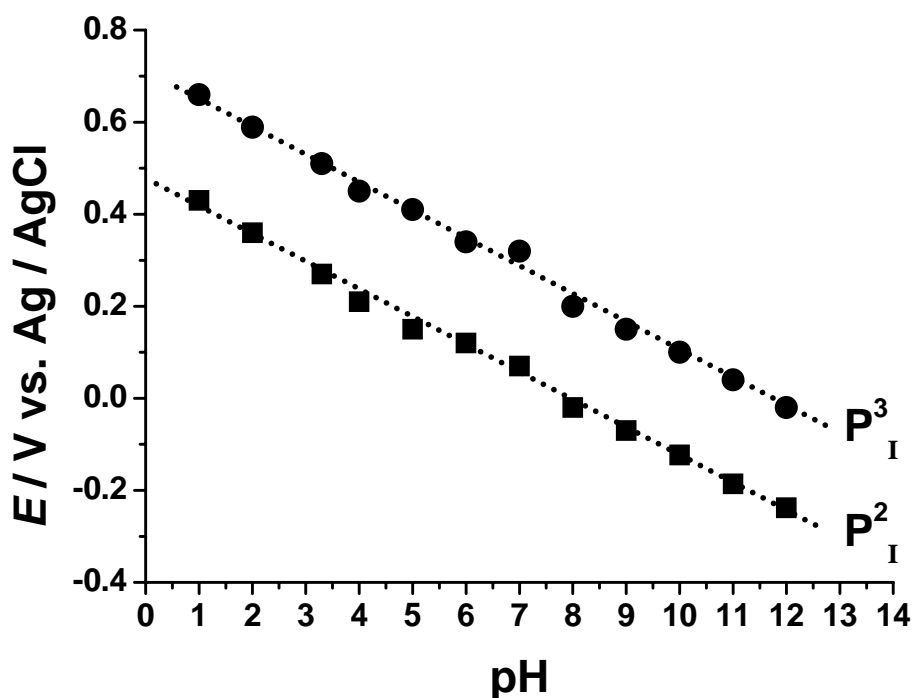


Figura 6.5 Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^2 pico P_1^2 e do (●) E_p^3 do pico P_1^3 .

Para os dois picos, os potenciais são sempre dependentes do pH, deslocando-se para valores de potencial mais negativos com o aumento do pH, **Figura 6.5**. As relações são lineares e a inclinação das rectas 60 mV por unidade de pH do electrólito de suporte, indica que o número de prótons transferidos durante a oxidação é igual ao número de electrões. Considerando que a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico P_1^2 é 45 mV e do pico P_1^3 60 mV, é possível concluir que estes processos de oxidação ocorrem com a transferência de dois electrões e dois prótons [238].

Foi efectuada voltametria de SW numa solução de 50 μ M de indol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0. O primeiro varrimento, registado numa superfície limpa de GCE, mostrou a ocorrência de um pico de oxidação, **Figura 6.6**.

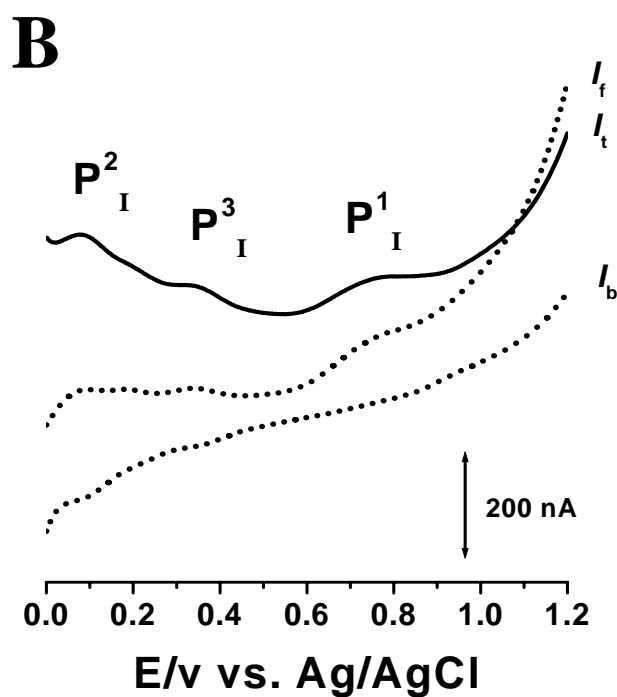
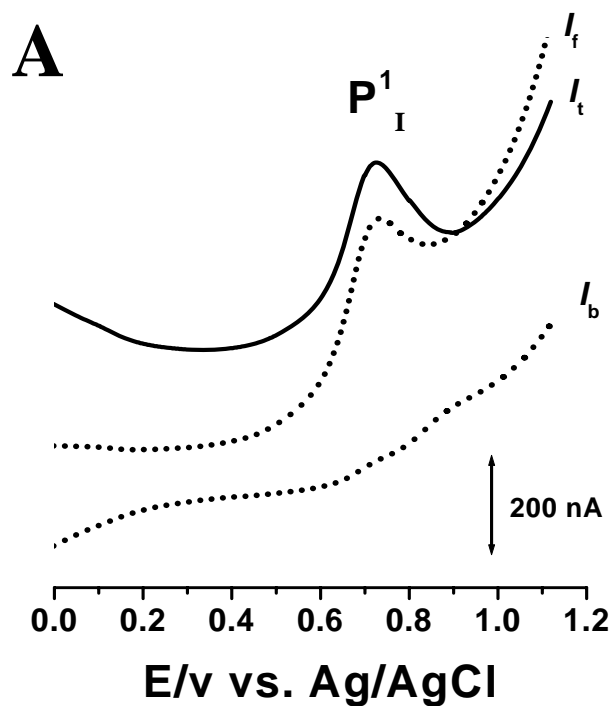


Figura 6.6 Voltamograma de SW, obtida numa solução de 50 μM de indol em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (A) primeiro e (B) segundo varrimento; $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV, I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

A irreversibilidade de pico P^1_I foi confirmada através das componentes directa e inversa da corrente total do pico. No segundo voltamograma apareceram dois picos reversíveis de oxidação, P^2_I e P^3_I , correspondentes à oxidação dos produtos de oxidação do indol, **Figura 6.6**.

6.3 DERIVADOS DE INDOL C3 SUBSTITUÍDOS

O mecanismo de oxidação do indol é influenciado pela existência de grupos substituintes no carbono C3. Um grupo de derivados (D) de indol, **Figura 6.1**, foi estudado por voltametria de DP na superfície de GCE. Em soluções de 25 μM de indol-3-acetamida (IAM), triptamina, gramina, ácido indol acético (*indol acetic acid* – IAA), ácido indol propiónico (*indol propionic acid* – IPA) ou ácido indol butírico (*indol butyric acid* – IBA) em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 6.7**, foram registados dois voltamogramas sucessivos no intervalo de potencial entre 0,00 V e + 1,20 V.

Os primeiros voltamogramas de DP registados para IAM, triptamina, gramina, IAA, IPA e IBA mostraram, para cada composto, dois picos consecutivos de oxidação, P^1_D a $E_p \sim + 0,65$ V e P^2_D a $E_p \sim + 1,00$ V, **Figuras 6.7A – 6.7F**.

Nos varrimentos seguintes apareceram novos picos de oxidação a potenciais menos positivos, P^3_D a $E_p \sim + 0,07$ V e P^4_D a $E_p \sim + 0,33$ V, **Figuras 6.7A – 6.7F**. Estes picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação dos derivados indólicos, formados na superfície do CGE durante o primeiro varrimento. Além disso, foi observada, uma diminuição das correntes dos picos P^1_D e P^2_D , devido à adsorção dos produtos de oxidação que bloqueiam o eléctrodo.

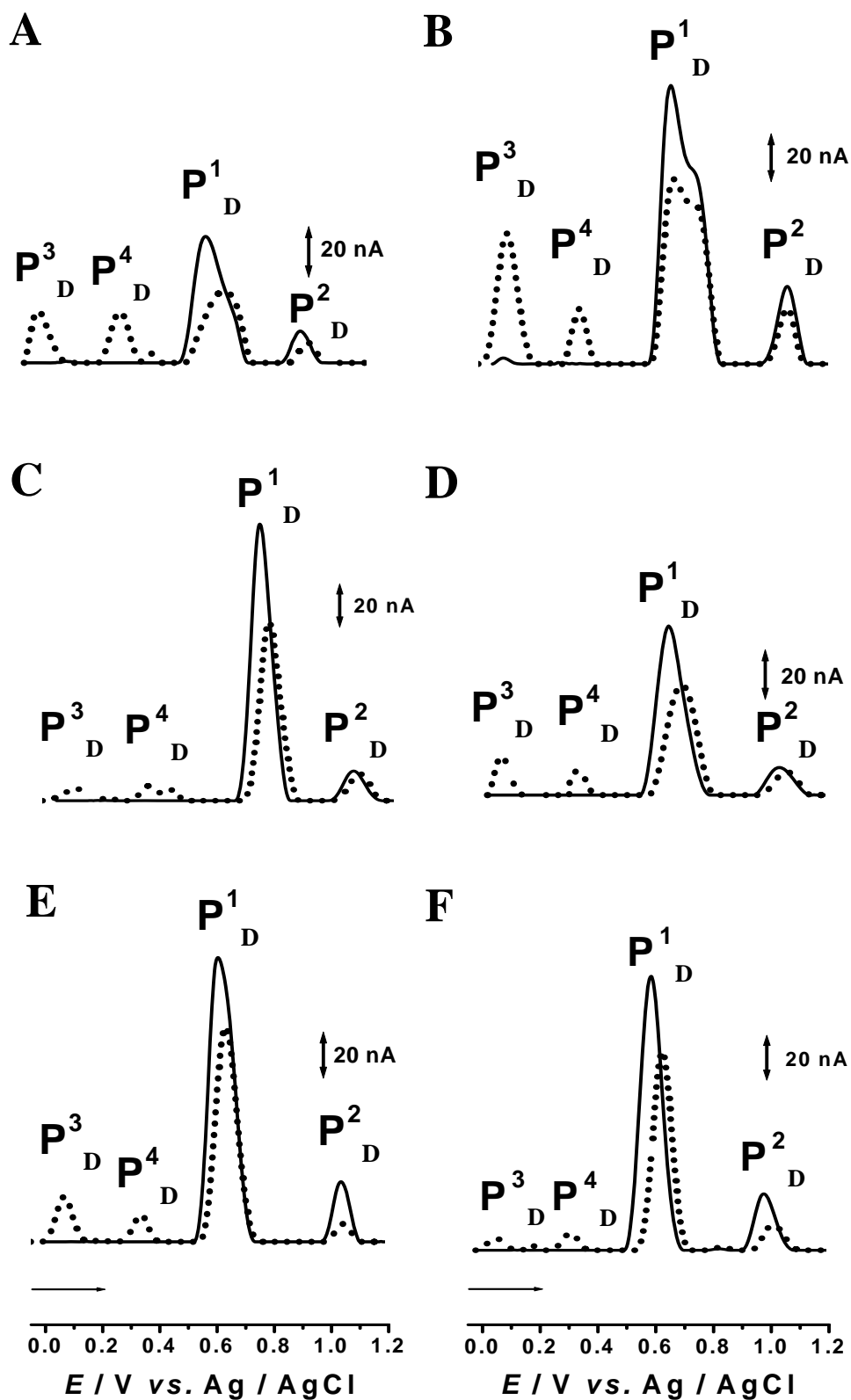


Figura 6.7 Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos em soluções em 0.1 M tampão fosfato pH = 7.0 de 25 μ M de (A) IAM, (B) triptamina, (C) gramina, (D) IAA, (E) IPA e (F) IBA: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

Tabela 6.1 Potenciais dos picos de oxidação dos derivados de indol com substituinte na posição C3 e dos seus produtos de oxidação.

Composto	Potenciais dos picos do primeiro varrimento (V)		Potenciais dos picos dos produtos de oxidação do segundo varrimento (V)	
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
IAM	0,64	1,00	0,07	0,33
Triptamina	0,64	1,02	0,07	0,33
Gramina	0,69	1,00	0,08	0,34
IAA	0,64	1,03	0,07	0,33
IPA	0,64	1,04	0,09	0,34
IBA	0,63	1,00	0,07	0,33

A pequena variação nos valores de potencial que ocorrem os picos de oxidação dos derivados de indol e dos seus produtos de oxidação, **Tabela 6.1**, é devida às diferenças entre os grupos substituintes da posição C3 do anel pirrol da molécula de indol.

Para determinar qual dos processos oxidativos correspondentes aos picos P^1_D ou P^2_D , levam à formação de produtos de oxidação electroactivos, foram efectuadas novas experiências, sendo tomada como exemplo os resultados obtidos com a molécula de IAA.

O primeiro voltamograma de DP registado numa solução de 25 μM de IAA em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, entre os limite de potencial de 0,00 V e + 1,20 V, mostrou a ocorrência de dois picos de oxidação, P^1_D a $E_p = + 0,64$ V e P^2_D a $E_p = + 1,03$ V. No segundo voltamograma, registado nas mesmas condições experimentais que o primeiro voltamograma e sem limpar a superfície do GCE, apareceram os dois novos picos de oxidação, P^3_D e P^4_D , **Figura 6.8**.

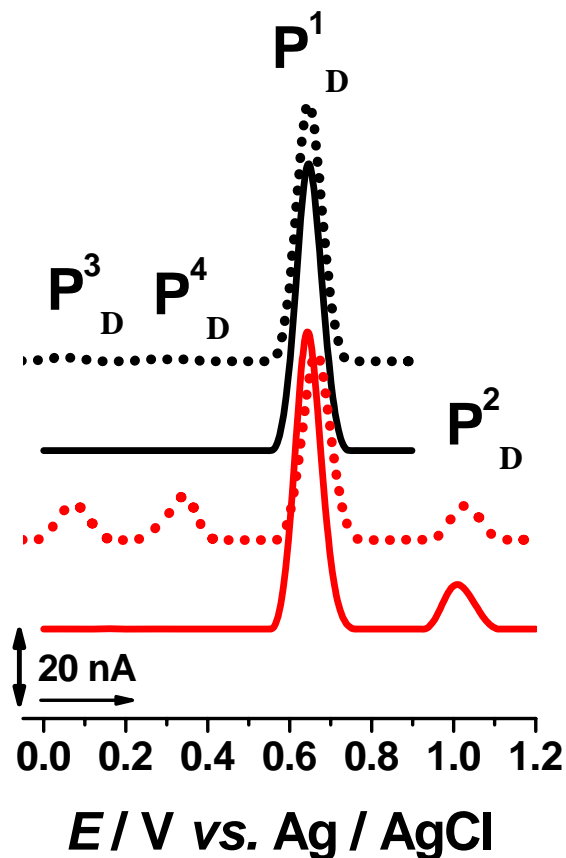


Figura 6.8 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, obtidos na solução de 25 μM de IAA em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento registrado entre 0,0 V e + 0,9 V e (—) primeiro e (•••) segundo varrimento registrado entre 0,0 V e + 1,2 V.

Para esclarecer qual dos picos P^1_D ou P^2_D , levou à formação dos produtos de oxidação, as mesmas experiências foram repetidas no intervalo de potencial entre 0,00 V e + 0,90 V, logo depois da ocorrência do pico P^1_D e antes do aparecimento do pico P^2_D , **Figura 6.8**. Assim, o segundo voltamograma mostrou apenas a ocorrência do pico P^1_D e nenhum outro pico correlacionado com os produtos da oxidação do IAA foi observado, **Figura 6.8**. Deste modo foi possível demonstrar com clareza que os picos P^3_D e P^4_D estão relacionados com a oxidação dos produtos de oxidação do IAA formados durante o processo de oxidação correspondente ao pico P^2_D .

6.4 MECANISMOS DE OXIDAÇÃO

No intervalo de pH de 3,0 a 12,0, a oxidação electroquímica do indol ocorre com a transferência de um electrão e um protão, enquanto que em meios ácidos, $\text{pH} < 3,0$, apenas é transferido um electrão.

O mecanismo de oxidação do indol está representado na **Figura 6.9**. Durante a oxidação do indol (**1**), pico P^1_1 na **Figura 6.2**, é transferido um electrão, processo seguido pela desprotonação da molécula, o que leva a formação de um radical (**2**). Este radical tem seis isómeros de ligação, ou seja, há seis locais possíveis de substituição de um átomo de hidrogénio do indol pelo ataque nucleofílico da água. O tautómero mais estável, com menor energia, é o 7-hidroxi indol (**3**), onde o radical OH^\bullet está ligado ao C7 de benzeno [58].

O grupo OH da posição C7 de grupo fenol da molécula de 7-hidroxi indol (**3**) é oxidado instantaneamente, uma vez que o potencial de oxidação deste grupo fenol ocorre para valores de potencial menos elevados do que o potencial de oxidação do pico P^1_1 . Esta oxidação envolve a transferência de um electrão e um protão, com a formação de um radical fenóxido que não é termodinamicamente estável. A estabilização do grupo radical fenóxido do indol pelo ataque nucleofílico da água resulta na formação de dois produtos electroactivos nas posições *para* e *orto*. Estes produtos oxidam-se num mecanismo redox reversível que envolve a transferência de dois electrões e dois protões: o pico P^2_1 corresponde à oxidação da *para*-quinona (**4**) a hidroquinona (**6**), e o pico P^3_1 corresponde à oxidação da *orto*-quinona (**5**) a catecol (**7**), **Figura 6.2**.

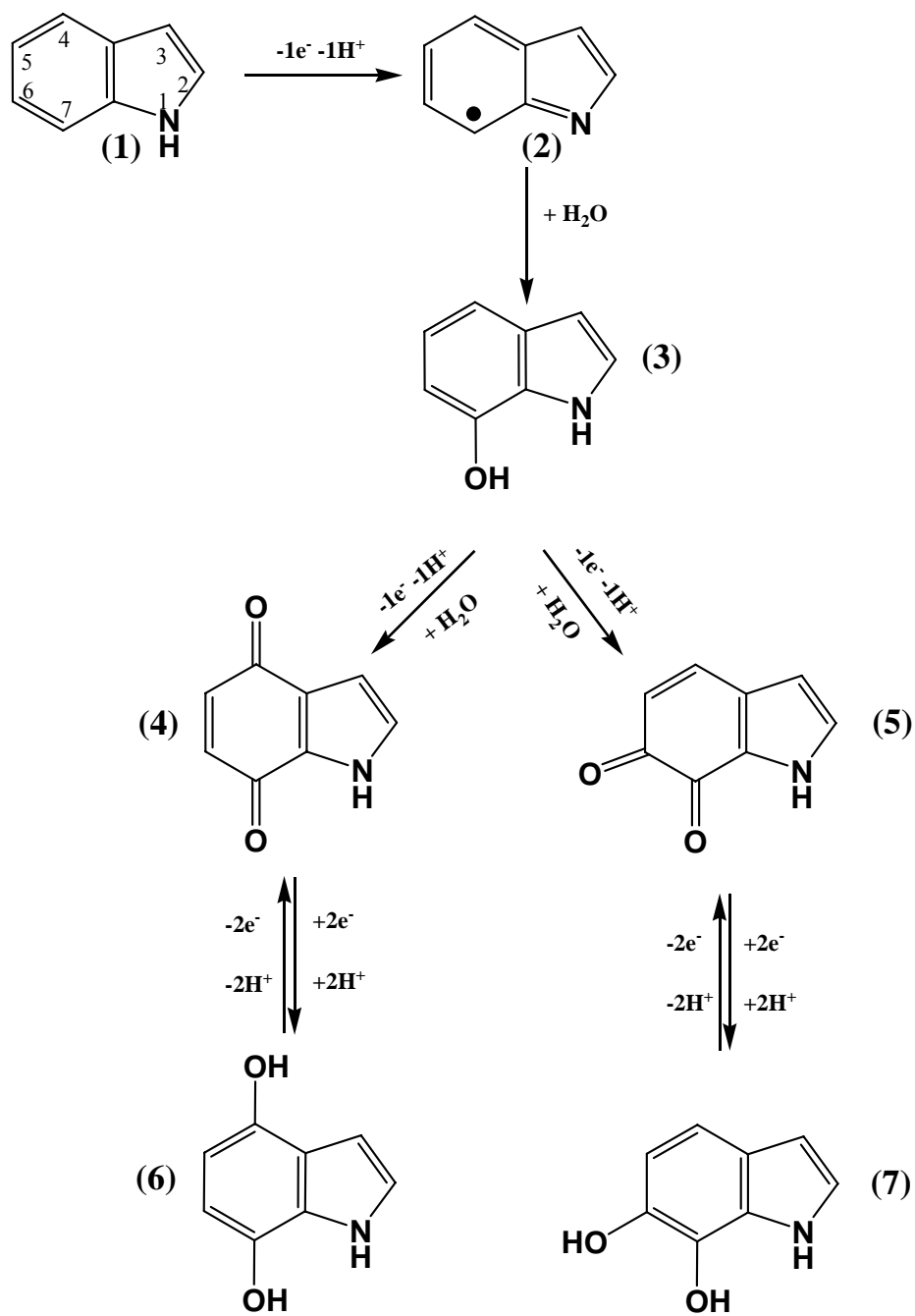


Figura 6.9 Esquema do mecanismo de oxidação do indol proposto.

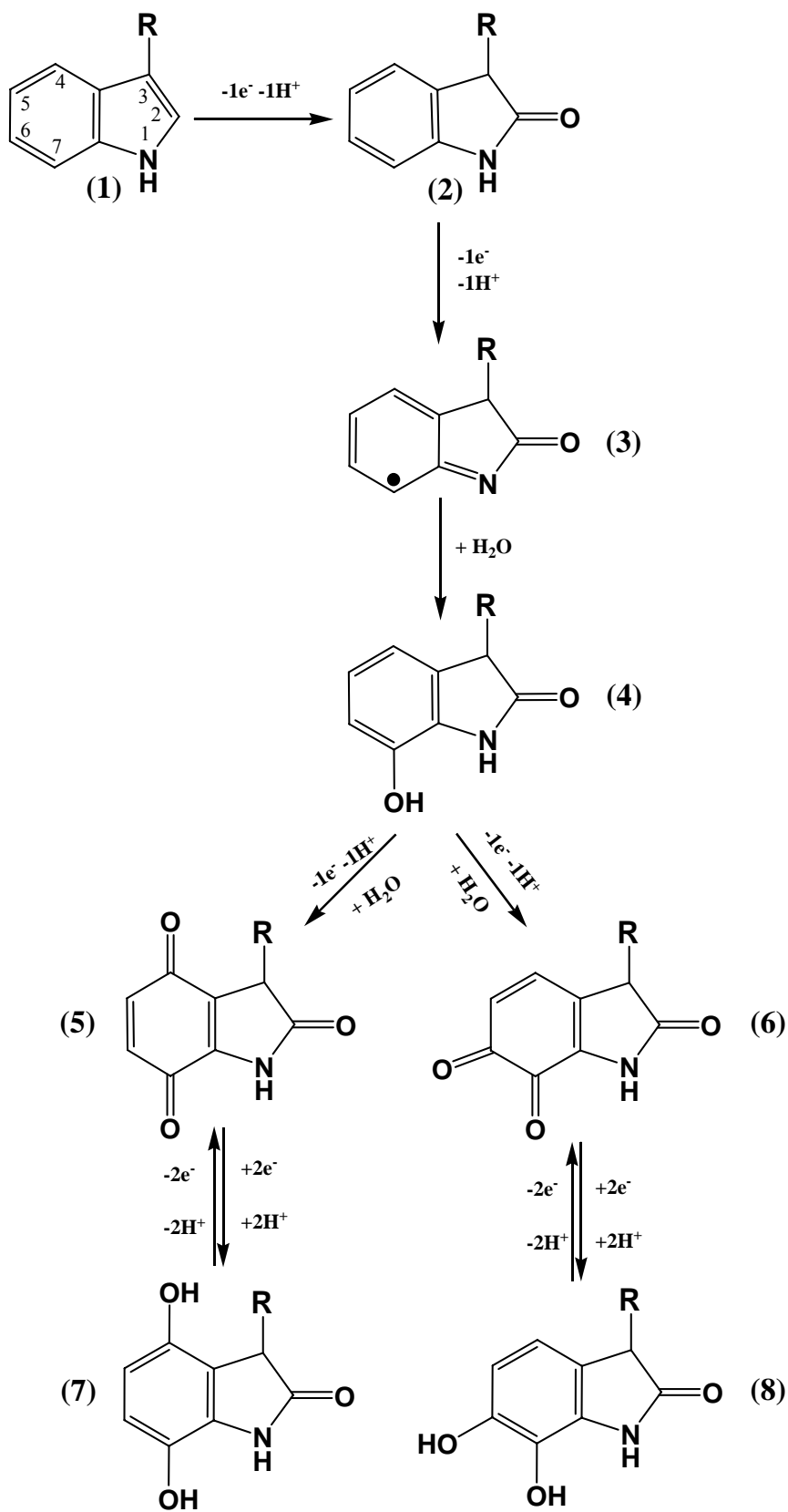


Figura 6.10 Esquema do mecanismo de oxidação dos derivados de indol C3 substituídos proposto.

O mecanismo de oxidação dos derivados de indol esta representado na **Figura 6.10**. Para estes derivados o anel benzénico da molécula de indol é menos reactivo que o anel pirrol. Uma vez que todos os derivados de indol estudados são substituídos na posição C3, a reacção de oxidação que ocorre no primeiro passo, o pico P^1_D da **Figura 6.7**, corresponde à oxidação do anel pirrol na posição C2 [25, 27].

Considerando todos os resultados obtidos com os derivados de indol estudados é possível concluir que o primeiro passo da oxidação destes compostos, pico P^1_D , ocorre na posição C2 do anel de pirrol e corresponde a uma reacção em que os derivativos de indol (**1**) com um substituinte na posição C3 são oxidados para espécies de 2-oxi-indoles (**2**).

A oxidação seguinte das espécies (**2**) corresponde ao pico P^2_D e leva a formação do radical (**3**). A estabilização de (**3**) por ataque nucleofílico da água leva à formação de vários produtos, tais como 2,4-, 2,5-, 2,6- e 2,7-oxindoles. O tautômero mais estável, com a energia mais baixa, é o 2,7-oxi-indol (**4**) [58].

Uma vez que o grupo fenol da molécula de 2,7-oxi-indol (**4**) se oxida a um potencial mais baixo do que o potencial de oxidação do pico P^2_D , a oxidação de (**4**) ocorre instantaneamente, através da transferência de um electrão e um protão, levando a formação de um grupo radical fenóxido. A estabilização deste radical fenóxido pelo ataque nucleofílico da água, resulta na formação de dois produtos electroactivos nas posições *para* e *orto*. Os dois produtos são electroactivos e apresentam um mecanismo redox reversível envolvendo a transferência de dois electrões e dois protões: o pico P^3_D correspondente à oxidação da *para*-quinona (**5**) a hidroquinona (**7**), e o pico P^4_D correspondente à oxidação da *orto*-quinona (**6**) a catecol (**8**), **Figura 6.7**.

Os mecanismos de oxidação propostos nas **Figuras 6.9** e **6.10** descrevem os processos de oxidação no GCE do indol, dos derivados de indol C3 substituídos e dos seus produtos de oxidação, através da hidroxilação do grupo benzeno da molécula de indol e da oxidação do grupo fenol.

6.5 CONCLUSÕES

O comportamento voltamétrico do indol e dos derivados indólicos com um substituinte na posição C3 foi estudado na superfície de GCE, e os seus mecanismos de oxidação foram propostos.

A oxidação electroquímica do indol é irreversível, ocorrendo com a transferência de um electrão e um protão. O processo de oxidação dos compostos indólicos que apresentam um grupo substituinte no carbono C3 do indol é mais complexo e ocorre em dois passos irreversíveis, dependentes do pH. O primeiro passo corresponde à oxidação do carbono C2 do anel pirrol, e o segundo passo corresponde á hidroxilação do grupo benzeno na posição C7, com a formação de espécies electroactivas contendo grupos fenol. A oxidação destes grupos fenol leva à formação de dois produtos de oxidação electroactivos nas posições *para* e *orto*, que adsorvem na superfície do eléctrodo e são por sua vez oxidados de maneira reversível.

Capítulo 7

Estudo voltamétrico da berberina e sanguinarina

7.1 INTRODUÇÃO

As propriedades farmacocinéticas dos alcalóides berberina e sanguinarina, **Figura 7.1**, nos processos biológicos, tais como as propriedades anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante e imunoestimulatória, têm sido evidenciadas por vários estudos [87-92, 97-145]. Estes compostos apresentam também a capacidade de interagir e inibir várias enzimas e proteínas, nomeadamente insulina, p53, proteína kinase C, proteína fosfatase 2C e albumina sérica humana [90, 91, 115-118, 129, 140, 141].

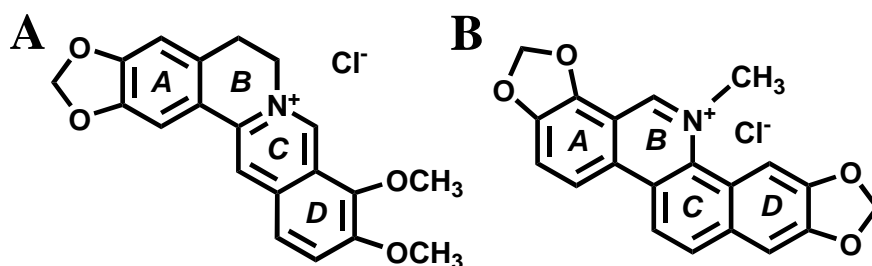


Figura 7.1 Estruturas químicas: (A) cloreto de berberina, (B) cloreto de sanguinarina

Os alcaloides berberina e sanguinarina podem participar em diversas reacções redox no meio intracelular e o objectivo deste capítulo é a investigação das suas propriedades de transferência de electrões. O comportamento voltamétrico e o mecanismo de oxidação destas moléculas foram investigados por técnicas de

voltametria cíclica, de DP e de SW, na superfície do GCE, numa ampla gama de pH, [4,5].

A investigação dos mecanismos redox forneceu informações valiosas sobre as reacções redox desta classe de moléculas, resultando num melhor entendimento dos mecanismos fisiológico da acção da sanguinarina, berberina e outros alcalóides com estrutura química semelhante.

7.2 BERBERINA

7.2.1 Voltametria cíclica

No primeiro voltamograma cíclico obtido numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3, registado com a velocidade de varrimento de $v = 150 \text{ mVs}^{-1}$, foram observados dois picos anódicos: o pico 1_a a $E_{\text{pa}}^1 = + 0,74 \text{ V}$, e o pico 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = + 1,33 \text{ V}$, **Figura 7.2**. No varrimento catódico apareceram dois pequenos picos, 5_c a $E_{\text{pc}}^5 = + 0,23 \text{ V}$ e 6_c a $E_{\text{pc}}^6 = + 0,40 \text{ V}$, correspondentes à redução do produto de oxidação da berberina formado na superfície do CGE durante a o primeiro varrimento positivo.

No voltamograma seguinte registado na mesma solução e sem limpar a superfície do GCE aparecem novos picos de oxidação, o pico 5_a a $E_{\text{pa}}^5 = + 0,28 \text{ V}$, e o pico 6_a a $E_{\text{pa}}^6 = + 0,47 \text{ V}$. Os pares de picos 5_a – 5_c e 6_a – 6_c correspondem às reacções reversíveis dos produtos de oxidação da berberina. Aumentando o número de varrimentos registados, observou-se a diminuição das correntes dos picos 1_a e 2_a, pois a adsorção dos produtos de oxidação da berberina na superfície do CGE reduzem a área disponível na superfície do eléctrodo.

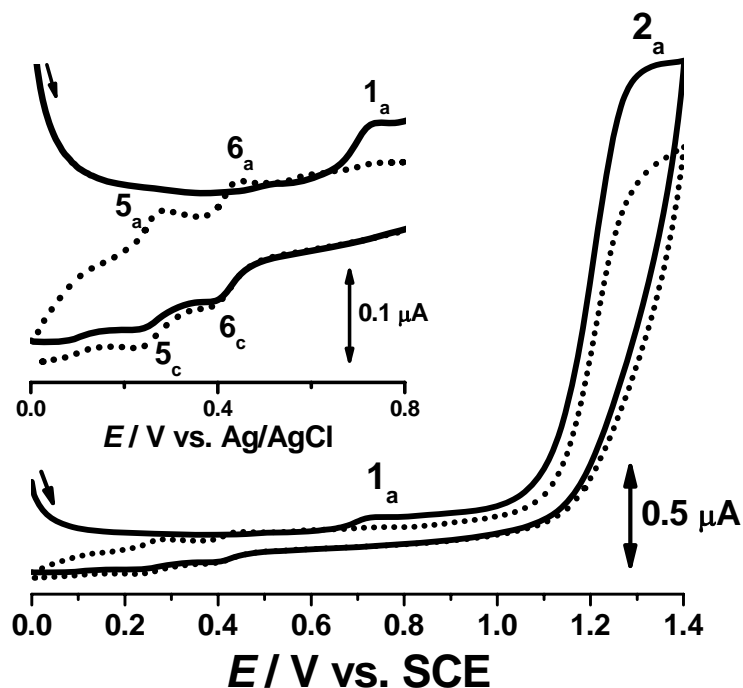


Figure 7.2 Voltamogramas cíclicos com subtracção da linha de base, obtidos numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3: (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.

No voltamograma seguinte registado na mesma solução e sem limpar a superfície do GCE aparecem novos picos de oxidação, o pico 5_a a $E_{\text{pa}}^5 = +0,28 \text{ V}$, e o pico 6_a a $E_{\text{pa}}^6 = +0,47 \text{ V}$. Os pares de picos 5_a – 5_c e 6_a – 6_c correspondem às reacções reversíveis dos produtos de oxidação da berberina. Aumentando o número de varrimentos registados, observou-se a diminuição das correntes dos picos 1_a e 2_a, pois a adsorção dos produtos de oxidação da berberina na superfície do CGE reduzem a área disponível na superfície do eléctrodo.

Noutra experiência foram efectuadas vários varrimentos de voltametria cíclica numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, com diferentes velocidades de varrimento, utilizando sempre uma superfície limpa do GCE, **Figura 7.3.**

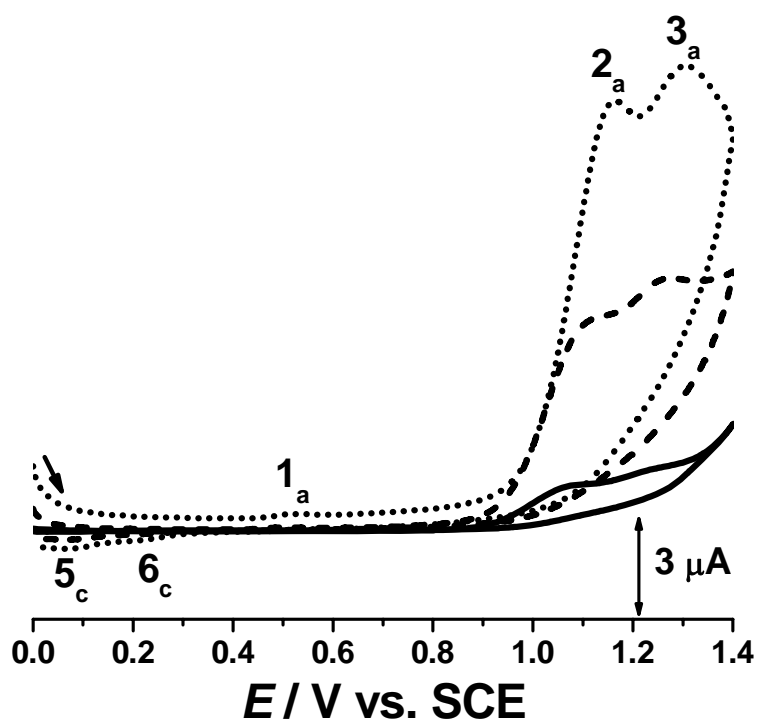


Figure 7.3 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (—) 10, (---) 100 e (•••) 500 mV s^{-1} .

Além dos picos 1_a a $E_{pa}^1 = + 0,52 \text{ V}$ e 2_a a $E_{pa}^2 = + 1,08 \text{ V}$, um novo pico 3_a , ocorreu a um potencial superior, $E_{pa}^3 = + 1,25 \text{ V}$. Aumentando a velocidade de varrimento para 100 e 500 mV s^{-1} , foi observado o aumento das correntes dos picos.

7.2.2 Voltametria de impulso diferencial

No primeiro voltamograma DP registado na superfície do CGE numa solução de 100 μM de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3, foram observados três reacções consecutivas de transferência de carga: pico 1_a a $E_{pa}^1 = + 0,65 \text{ V}$, pico 2_a a $E_{pa}^2 = + 1,17 \text{ V}$ e pico 3_a a $E_{pa}^3 = + 1,35 \text{ V}$, **Figura 7.4**.

No voltamograma seguinte, apareceram três novos picos anódicos: pico 4_a a $E_{pa}^4 = +0,09$ V, pico 5_a a $E_{pa}^5 = +0,27$ V e pico 6_a a $E_{pa}^6 = +0,41$ V. Estes três picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da berberina, formados na superfície do CGE, durante o primeiro varrimento.

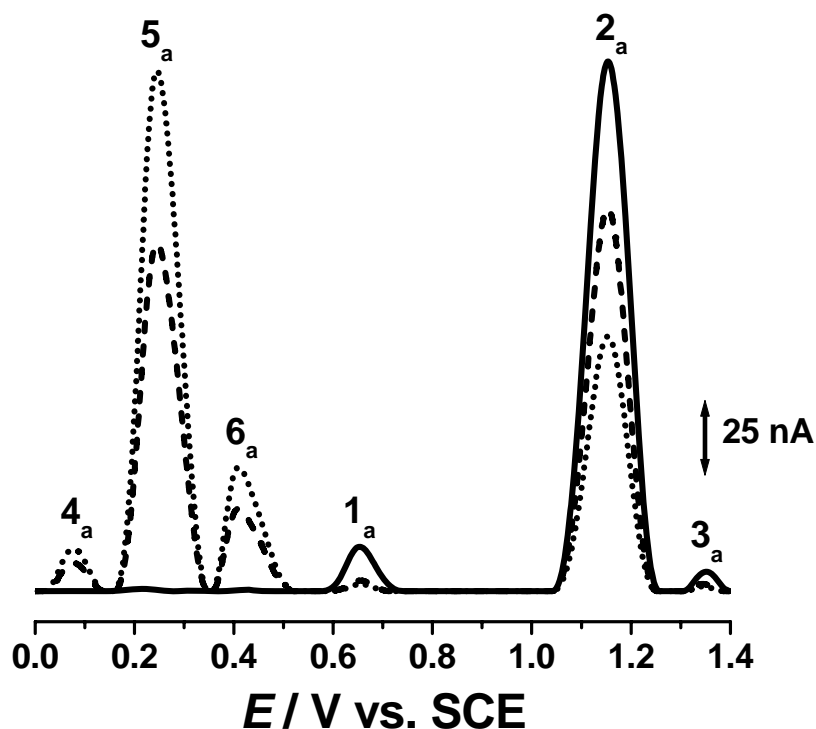


Figura 7.4 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base , obtidos em 100 μ M de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3; (—) primeiro, (---) segundo e (•••) terceiro varrimento.

Em voltamogramas sucessivos, obtidos na mesma solução e sem limpar a superfície do GCE, a corrente dos picos de oxidação 1_a, 2_a e 3_a, da berberina, diminuiu gradualmente com o aumento do número de varrimentos, devido à diminuição da área disponível de eléctrodo, causada pela adsorção dos produtos de oxidação da berberina na superfície do eléctrodo. Por outro lado, a corrente dos picos 4_a, 5_a e 6_a aumentou em

voltamogramas sucessivos devido à acumulação dos produtos de oxidação na superfície da GCE.

Estas experiências demonstraram que a oxidação da berberina ocorre num mecanismo em cadeia, envolvendo várias transferências de electrão e com a formação de diferentes produtos de oxidação electroactivos na superfície do eléctrodo. No entanto, considerando as três reacções de transferências de electrão é necessário identificar os processos que levam a formação dos produtos de oxidação. Por esta razão, experiências foram realizadas nas mesmas condições experimentais, mas os voltamogramas foram registados entre 0,00 V e diferentes limites de potencial positivo, correspondentes a cada processo redox da berberina, **Figura 7.5**.

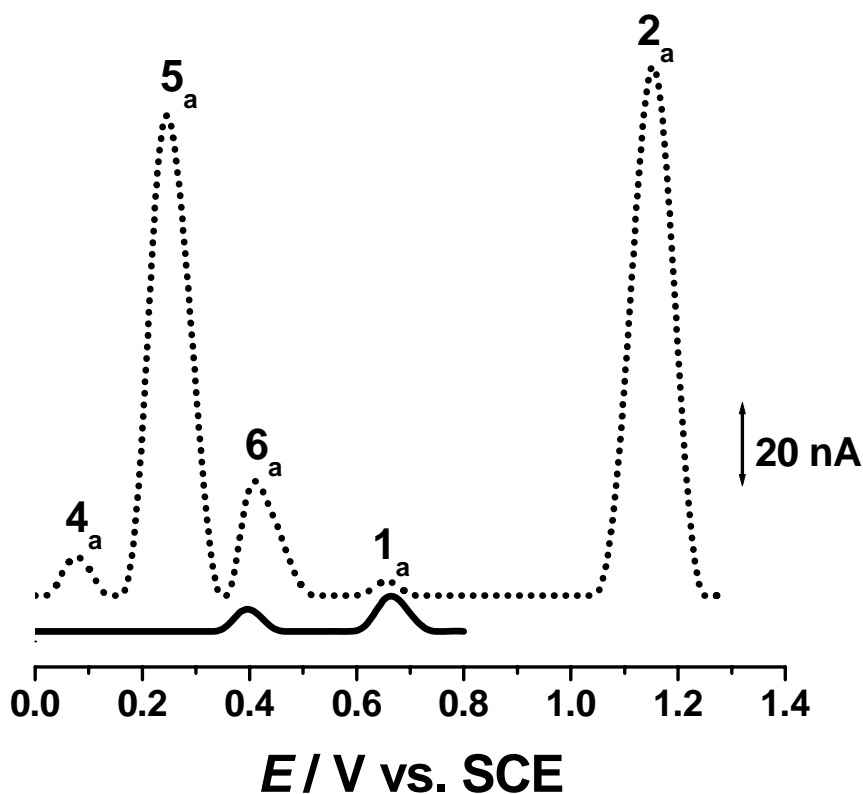


Figura 7.5 Segundo voltamograma de DP com correcção de linha de base, obtido em solução de 100 μM de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3, registado entre 0,00 V e: (—) + 0,80 V e (•••) + 1,28 V.

Na primeira experiência, registaram-se dois voltamogramas sucessivos de 0,00 V até ao limite de potencial positivo de + 0,80 V, depois do primeiro processo de oxidação da berberina, pico 1_a, mas antes de segundo processo correspondente ao pico 2_a. Nestas condições, no segundo voltamograma ocorreu somente o pico 6_a, **Figura 7.5**.

Na segunda experiência, depois de limpar a superfície do GCE, foram registados dois voltamogramas de DP sucessivos de 0,00 V até ao limite de potencial positivo de + 1,28 V, após o segundo processo de oxidação da berberina, pico 2_a. No primeiro varrimento ocorreram ambos os picos de oxidação 1_a e 2_a, enquanto que no segundo voltamograma, apareceram os três picos de oxidação 4_a, 5_a e 6_a, **Figura 7.5**.

Os voltamogramas de DP foram registados numa solução de 100 µM de berberina em diferentes soluções de electrólito de suporte com força iónica de 0,1 M, **Figura 7.6A**. Para pH < 2 e pH > 8, mesmo para concentrações elevadas de berberina, nenhum pico de oxidação foi observado.

Para valores de $3 \leq \text{pH} \leq 6$, foram observados os três picos de oxidação, enquanto que para pH = 2,0 e pH > 6, foram observados apenas os picos 1_a e 2_a e os seus valores de potencial diminuíram linearmente com o aumento do pH do electrólito de suporte. As inclinações das rectas, **Figura 7.6B**, são de 60 mV por unidade de pH para os três picos, o que significa que para $3 < \text{pH} < 6$ todos os processos de oxidação da berberina ocorre com a transferência do mesmo número de electrões e protões. Como a largura a meia altura ($W_{1/2}$) dos picos tem valores entre 45 mV e 60 mV, conclui-se que estes processos de oxidação ocorrem com transferência de dois electrões. Por outro lado, para valores de pH < 3,3 e pH > 6,2, o potencial de pico 2_a é independente do pH, envolvendo apenas a transferência de electrões [238].

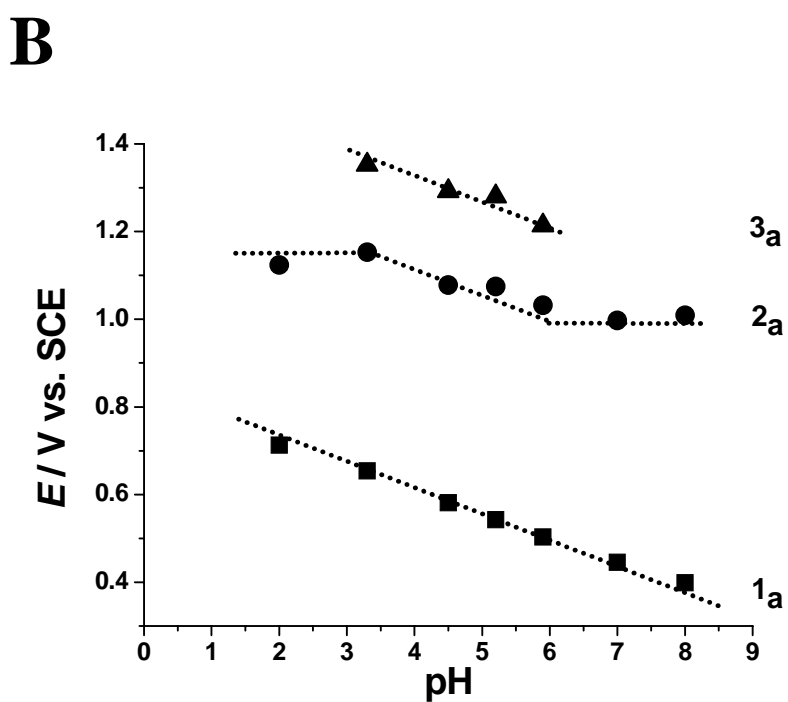
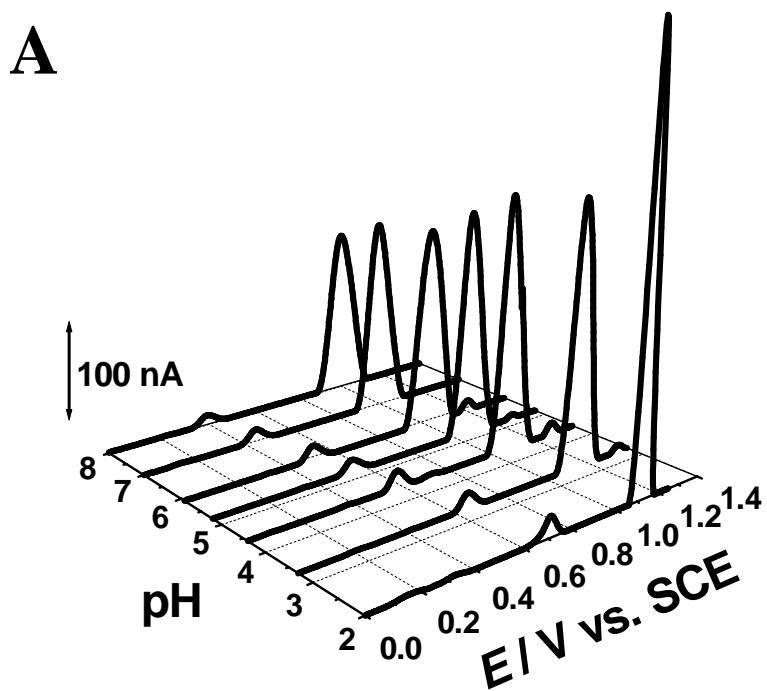


Figura 7.6 (A) Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos em soluções de 25 μM de berberina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH;

(B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^1 do pico 1_a,

(●) E_p^2 do pico 2_a, e (▲) E_p^3 do pico 3_a.

O comportamento electroquímico dos produtos de oxidação da berberina formados na superfície do GCE foi também estudado para os diferentes valores de pH, **Figura 7.7**. Para isso, foram registados dois voltamogramas de DP sucessivos numa solução de 100 μM de berberina, para diferentes soluções de electrólito de suporte.

Nos voltamogramas registados em electrólitos com valores de $2 < \text{pH} < 6$, ocorreram todos os picos de oxidação, 4_a , 5_a e 6_a . Contudo, para $\text{pH} > 6$, ocorreram apenas os picos 5_a e 6_a . Os potenciais dos picos são todos dependentes do pH, deslocando-se para valores mais negativos com o aumento do pH, **Figura 7.8**.

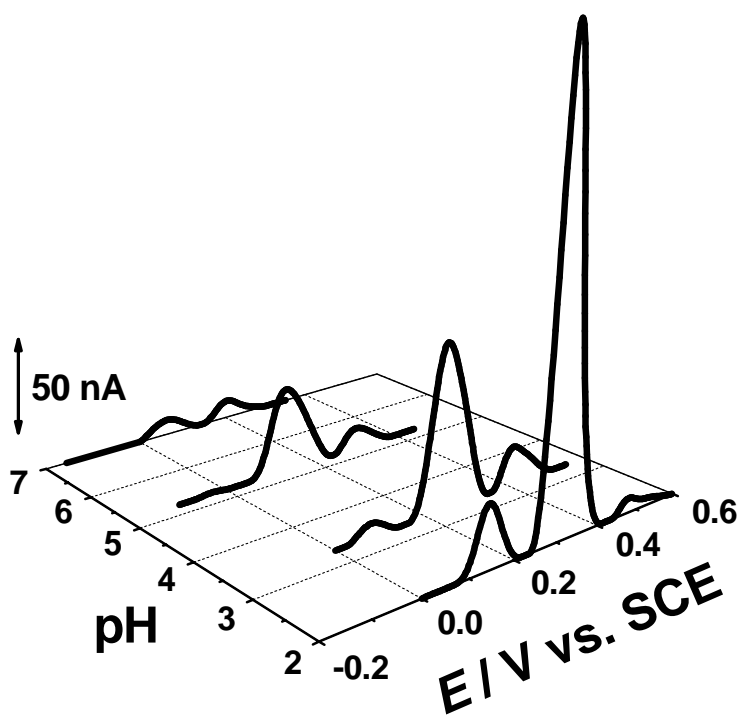


Figura 7.7 Segundo voltamograma de DP com correcção de linha de base, obtido em solução de 100 μM berberina, em diferentes electrólitos de suporte.

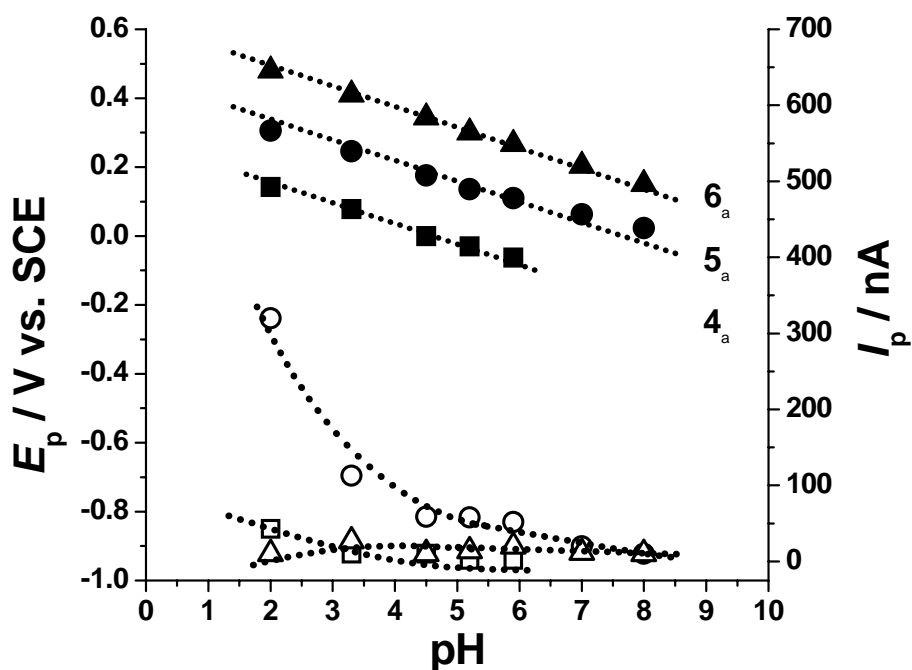


Figura 7.8 Gráfico da variação com pH do (■) E_{pa} e (□) I_{pa} de pico 4_a , (●) E_{pa} e (○) I_{pa} de pico 5_a e (▲) E_{pa} e (△) I_{pa} de pico 6_a .

A relação é linear e a inclinação das rectas para os picos 4_a , 5_a e 6_a foi de 60 mV por unidade de pH, o que significa que o número de prótons transferidos durante a oxidação é igual ao número de electrões. Além disso, observou-se que todas as correntes de pico diminuem com o aumento do pH do electrólito de suporte,

Figura 7.8.

7.2.3 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de SW foram registados numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3, **Figura 7.9A**. No primeiro voltamograma ocorreram apenas dois picos, pico 1_a a $E_{\text{pa}}^1 = +0,68 \text{ V}$ e pico 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = +1,21 \text{ V}$. A componente inversa da corrente total mostra um pequeno pico catódico, correspondente a uma redução parcial da berberina após o pico de oxidação 2_a a $E_{\text{pc}}^2 = +1,21 \text{ V}$.

No segundo voltamograma de SW ocorreram todos os picos dos produtos de oxidação da berberina, **Figura 7.9B**. A reversibilidade dos picos 4_a, 5_a e 6_a foi confirmada pelas componentes directa e inversa da corrente total. As correntes e os potenciais de oxidação e de redução para as espécies adsorvidas são iguais, confirmando que as espécies oxidadas ficam adsorvidas na superfície de eléctrodo.

Foram efectuados voltamogramas de SW para diferentes velocidades de varrimento numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 7.10A**. Embora para a velocidade de varrimento mais baixa, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, tenham sido observados apenas os picos 1_a a $E_{\text{pa}}^1 = 0,49 \text{ V}$ e 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = 1,05 \text{ V}$, aumentando a velocidade de varrimento para 50 e 200 mV s^{-1} , ocorreu o pico 3_a a um potencial mais positivo, $E_{\text{pa}}^3 = +1,25 \text{ V}$, **Figura 7.10A**.

Noutra experiencia foram efectuados vários voltamogramas sucessivos de SW numa solução de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 á velocidade de varrimento de $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$, **Figura 7.10B**. No primeiro voltamograma ocorreram todos os picos de oxidação da berberina, e os picos 5_a e 6_a foram observados em voltamogramas sucessivos registados na mesma solução e sem limpar a superfície do eléctrodo.

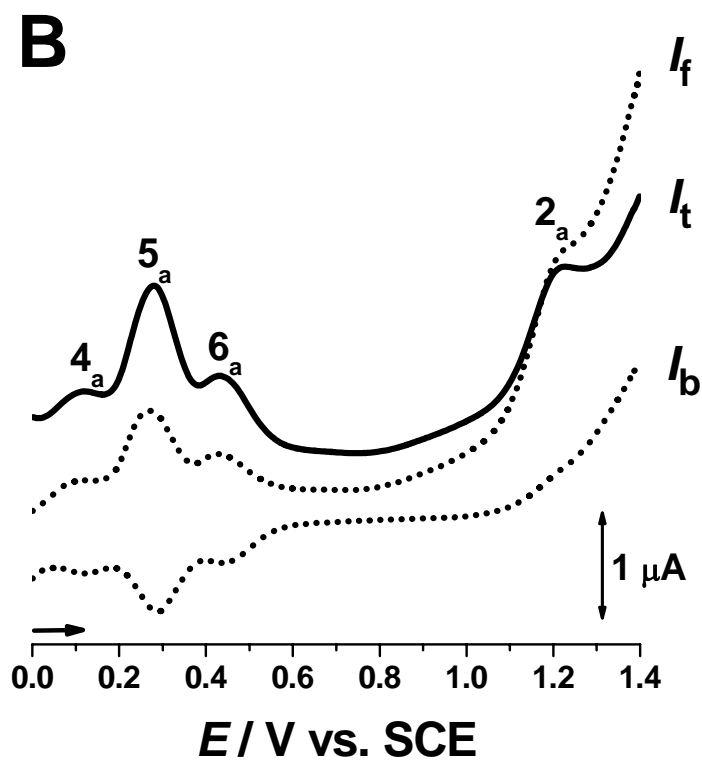
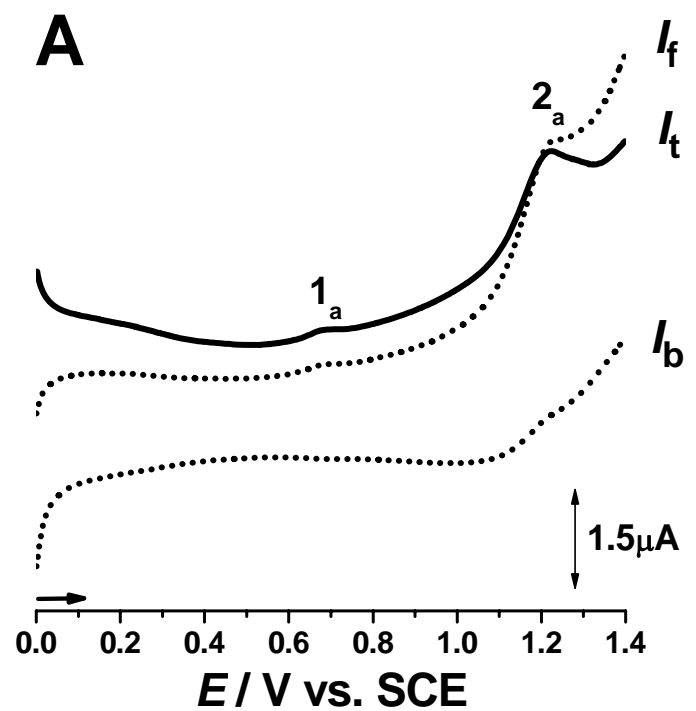


Figura 7.9 Voltamogramas de SW, obtidos com o GCE numa solução de 200 μM berberina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,3: (A) primeiro e (B) segundo varrimento; amplitude de pulso de 50 mV, I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

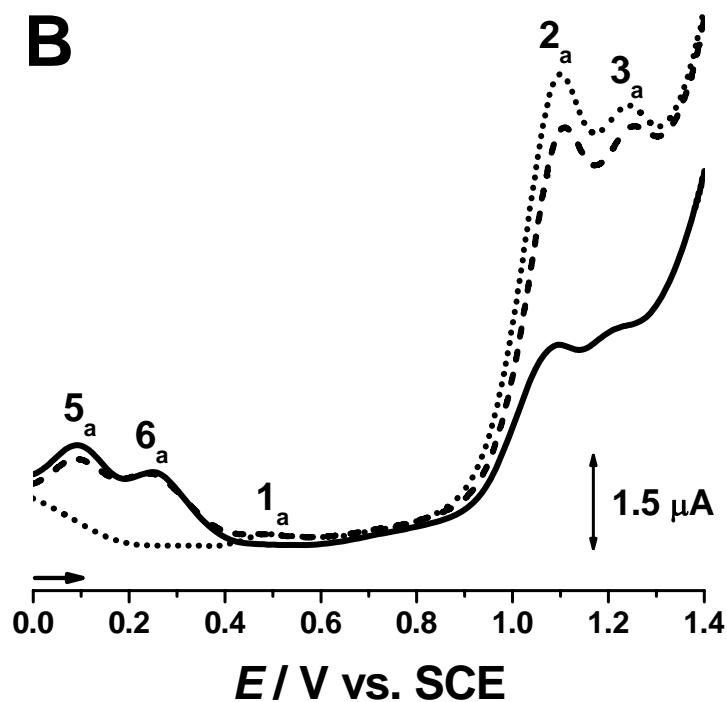
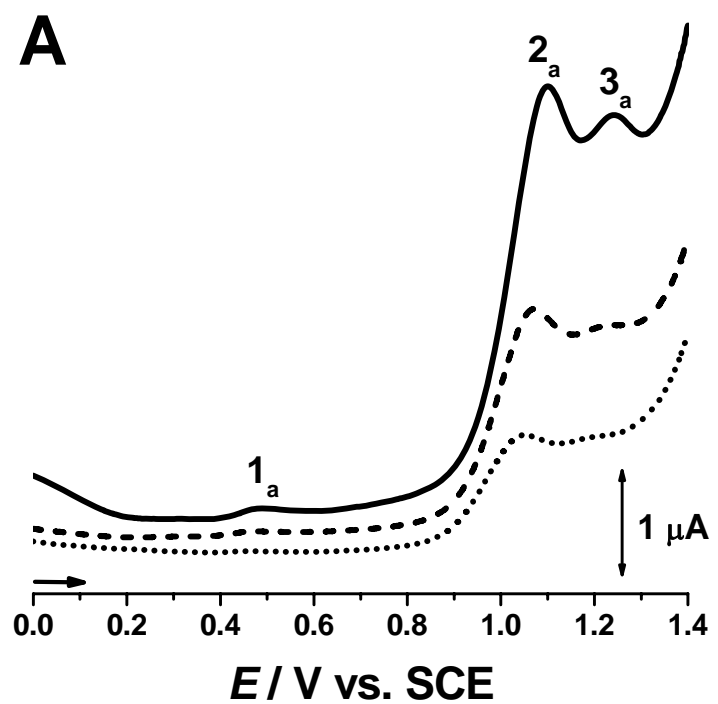


Figure 7.10 Voltamogramas de SW, obtidos em soluções de 200 μM de berberina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (A) primeiro varrimento a ($\bullet\bullet\bullet$) 10, ($-\cdot-\cdot-$) 25 e (—) 100 Hz, $v_{\text{eff}} = 20$, 50 e 200 mV s^{-1} , e (B) ($\bullet\bullet\bullet$) primeiro e ($-\cdot-\cdot-$) segundo varrimentos obtido em solução de berberina e (—) terceiro varrimento efectuado depois do eléctrodo ser transferido em tampão; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, amplitude de pulso de 50 mV, $v_{\text{eff}} = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Estes resultados mostram que, para ocorrer o processo oxidativo correspondente ao pico P₃, é necessário variar o potencial mais rapidamente do que a velocidade da reacção homogénea que a berberina oxidada sofre.

Depois de vários varrimentos de SW efectuados na solução, o eléctrodo foi lavado com água desionizada e transferido para o electrólito de suporte. A presença dos picos 5_a e 6_a nos voltamogramas de SW obtidos em electrólito de suporte confirmam a forte adsorção dos produtos da oxidação da berberina na superfície do GCE.

7.2.4 Mecanismo de oxidação

Para entender o mecanismo redox da berberina, os resultados obtidos através dos métodos electroquímicos foram comparados com a oxidação dos compostos com grupos electroactivos semelhantes, presentes nas estruturas da queleritrina, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e 3,4-metilenedioximetamfetamina (MDMA, “ecstasy”) [93-96].

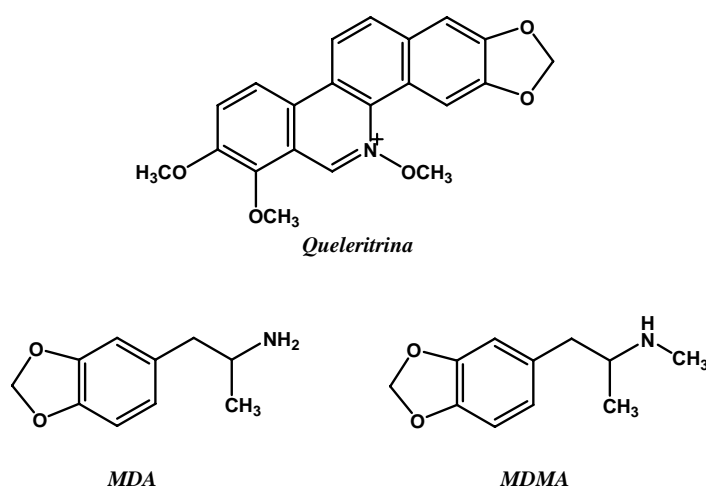


Figura 7.11 Estruturas químicas: queleritrina, MDA e MDMA.

A oxidação da queleritrina ocorre no anel de benzeno dioximetileno-substituído, levando à formação de uma molécula de *orto*-quinona, que sofre uma redução reversível a potenciais menos positivo [147, 151]. Os estudos electroquímicos realizados para a oxidação da MDMA em pH = 7,0 [93] mostraram a ocorrência de dois picos anódicos, a + 1,05 V e a + 1,26 V, enquanto que, para a oxidação do MDA, foi observado apenas um pico de oxidação ao mesmo valor de potencial que o do potencial do primeiro pico de oxidação da MDMA. Foi proposto para o MDMA que o primeiro pico de oxidação a + 1,05 V é devido à remoção dos electrões dos electróforos aromáticos, enquanto o segundo pico a + 1,26 V foi atribuído à oxidação do grupo amina secundária.

Estudos enzimáticos [94, 95, 96] demonstraram que tanto a MDA como a MDMA podem ser oxidados a um derivado da catecolamina, processo de oxidação que ocorre em várias etapas, mas quais a hidrólise e a desmetilação são as mais importantes, e ocorrem através da transferência de dois electrões [94]. Além disso, esses estudos demonstraram que o processo de desmetilação não está limitado à acção das enzimas e pode ser mediado por radicais hidróxilo [95]. Além disso, os derivados da catecolamina, da MDA e da MDMA podem sofrer oxidações reversíveis para formar uma espécie de *orto*-quinona.

Tomando em consideração todos os resultados obtidos para a oxidação electroquímica da berberina, bem como os dados da literatura acima apresentados, propõe-se que o primeiro pico de oxidação da berberina, 1_a, corresponde à remoção de electrões do anel dioximetileno da molécula da berberina, levando à formação de um produto que sofre redução reversível, pico 6_c, **Figura 7.12**.

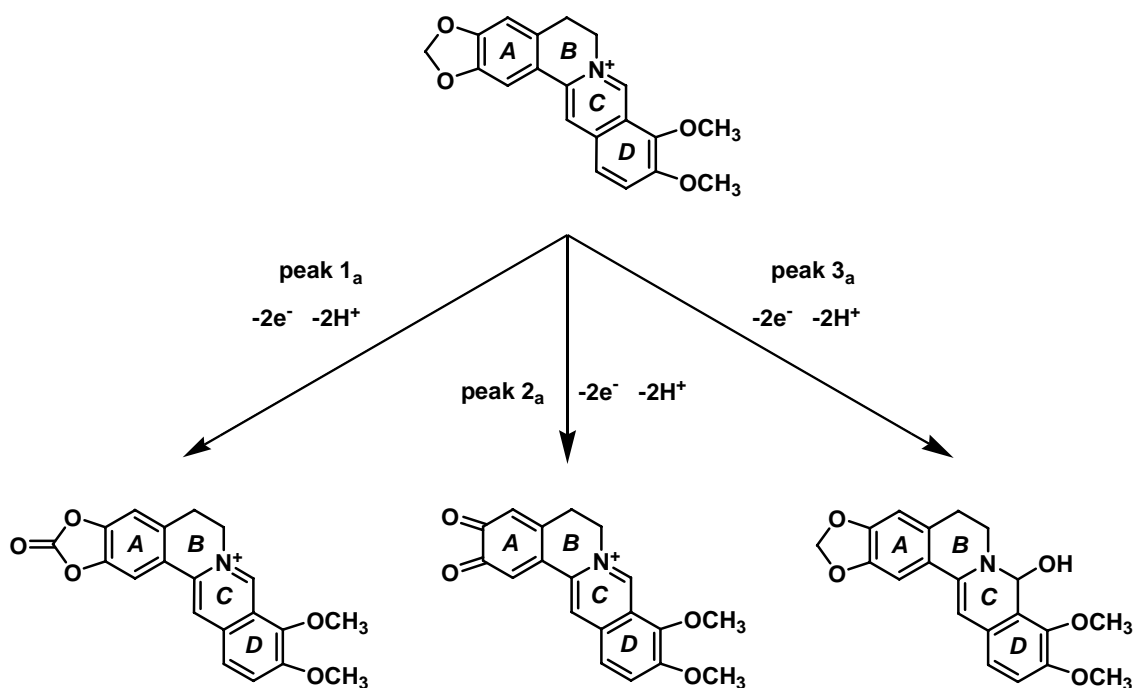


Figura 7.12 Mecanismo de oxidação da berberina.

O pico de oxidação 2_a a $E_{pa}^2 = + 1,05$ V em pH = 7,0 ocorre devido à remoção de dois electrões da dupla ligação entre C2 e C3 do anel A, levando à desmetilação e à formação dum derivado da catecolamina, que, por sua vez, sofre oxidação reversível, pico 4_a ou 5_a, formando uma espécie de *orto*-quinona, **Figura 7.12**.

7.3 SANGUINARINA

7.3.1 Voltametria cíclica

O voltamograma cíclico registado numa solução de 200 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,8, mostrou a ocorrência de vários picos anódicos: pico 1_a a $E_{\text{pa}}^1 = +0,85 \text{ V}$, pico 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = +1,12 \text{ V}$ e pico 3_a a $E_{\text{pa}}^3 = +1,36 \text{ V}$, **Figura 7.13**.

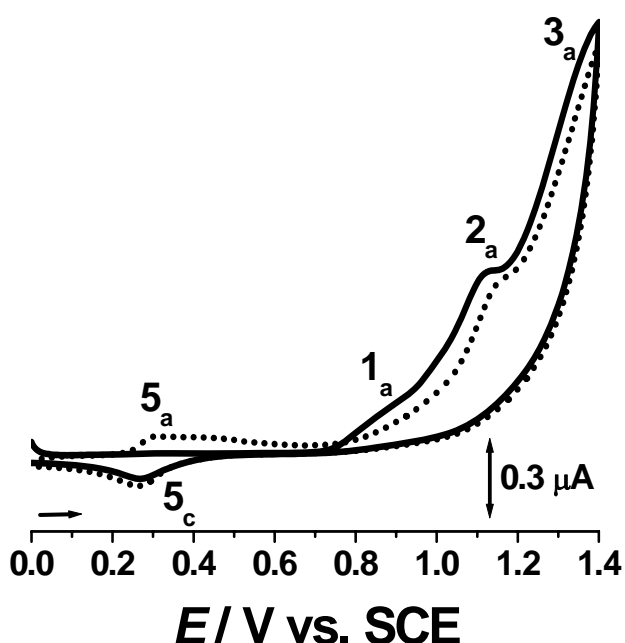


Figura 7.13 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos numa solução de 200 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão acetato pH = 3,8:

(—) primeiro e (•••) segundo varrimentos, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

No varrimento inverso ocorreu um pico catódico 5_c a $E_{\text{pc}}^5 = +0,26 \text{ V}$. Este pico corresponde à redução do produto de oxidação da sanguinarina formado na superfície do GCE. No segundo voltamograma, registado na mesma solução e sem limpar a superfície do GCE, apareceu um novo pico anódico, 5_a a $E_{\text{pa}}^5 = +0,31 \text{ V}$, que confirmou a reversibilidade de pico 5_c.

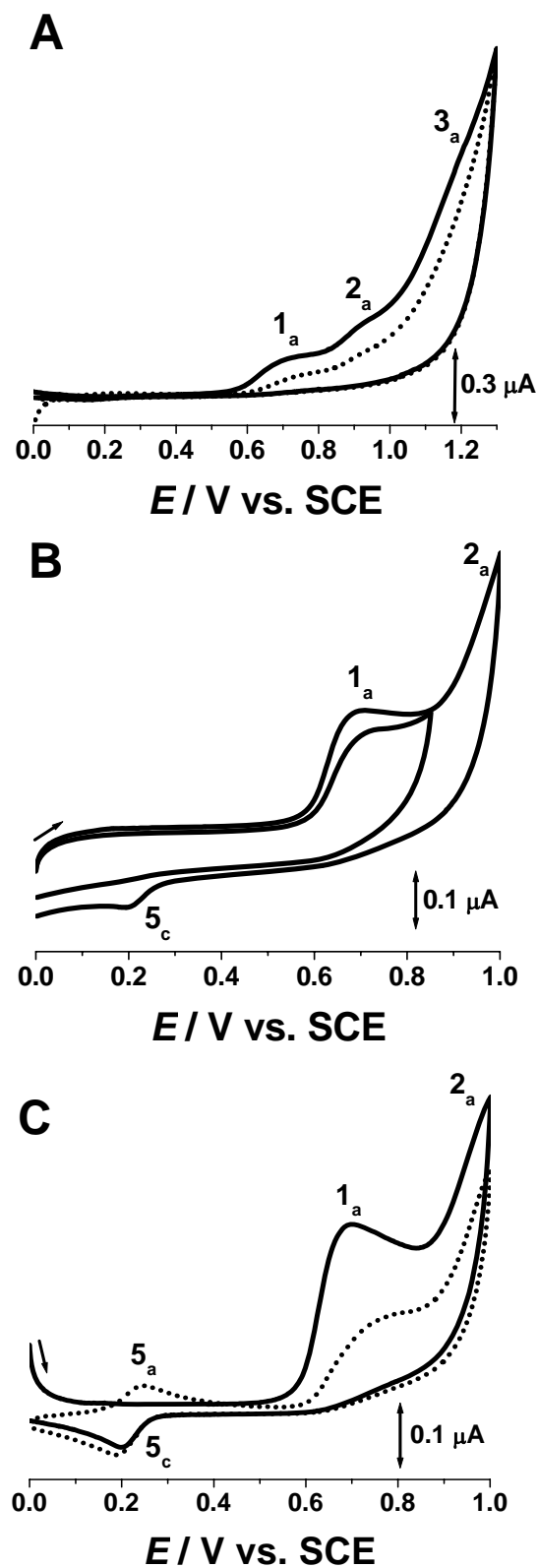


Figura 7.14 (A), (B) e (C): Voltamogramas cíclicos com subtração de linha de base, obtidos numa solução de 200 μM de sanguinarina em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Numa experiência realizada numa solução de 200 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 7.14A**, os três picos de oxidação ocorreram a potenciais menos positivos, mostrando que o processo de oxidação da sanguinarina é dependente do pH. Por outro lado, em pH = 7,0, a corrente do pico 1_a é superior à corrente do pico obtido em tampão acetato pH = 3,8, o que permitiu determinar qual dos picos, 1_a, 2_a ou 3_a, leva à formação do produto de oxidação.

Voltamogramas cíclicos foram registados na superfície limpa do GCE e nas mesmas condições experimentais, mas a direcção da varrimento foi invertida logo após o pico 1_a, imediatamente antes do pico 2_a. Neste caso, o pico de redução 5_c não apareceu, **Figura 7.14B**.

Quando o limite do potencial positivo foi aumentado, sendo o sentido de varrimento invertido imediatamente após o pico 2_a e antes do pico 3_a, o pico 5_c ocorreu a $E_{pc}^5 = +0,21 \text{ V}$. Deste modo, ficou demonstrado que o pico 5_c corresponde à redução do produto de oxidação da sanguinarina formado durante o processo oxidativo correspondente ao pico 2_a ao valor potencial $E_{pa}^2 = +0,95 \text{ V}$. No varrimento seguinte, no sentido positivo o pico 5_a ocorreu a $E_{pa}^5 = +0,25 \text{ V}$. A diferença entre os potenciais dos dois picos é $\Delta E^5 = E_{pa}^5 - E_{pc}^5 = 60 \text{ mV}$, de acordo com o valor teórico para uma reacção reversível que ocorre com a transferência de um electrão, **Figura 7.14C**.

Em varrimentos sucessivos foi observada a diminuição da corrente dos picos, devido á adsorção do produto de oxidação da sanguinarina na superfície do GCE, processo que reduz a área disponível da superfície do eléctrodo.

7.3.2 Voltametria de impulso diferencial

Voltamogramas sucessivos de DP foram registados numa solução de 100 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão acetato pH = 4,0, **Figura 7.15**. No primeiro voltamograma o pico 1_a foi observado a $E_{\text{pa}}^1 = + 0,74 \text{ V}$, o pico 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = + 0,94 \text{ V}$, o pico 3_a a $E_{\text{pa}}^3 = + 1,08 \text{ V}$ e um novo pico 4_a a $E_{\text{pa}}^4 = + 1,22 \text{ V}$.

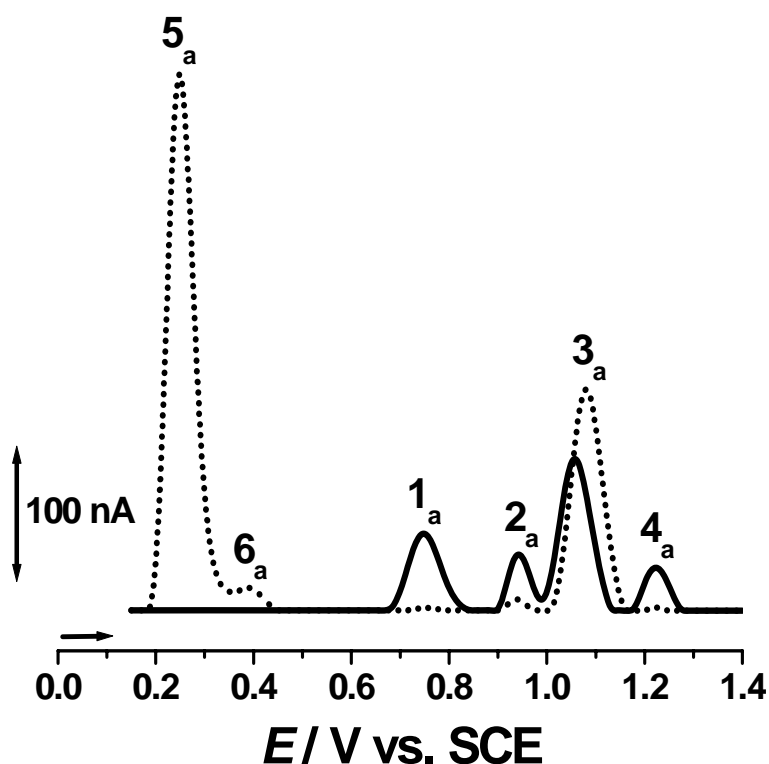


Figura 7.15 Voltamogramas de DP com correcção de linha da base, obtidos em solução de 100 μM de sanguinarina em 0,1 tampão acetato M pH = 4,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

No segundo voltamograma de DP, apareceram dois novos picos anódicos, o pico 5_a a $E_{\text{pa}}^5 = + 0,25 \text{ V}$ e o pico 6_a a $E_{\text{pa}}^6 = + 0,39 \text{ V}$. Estes picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da sanguinarina. A corrente dos picos 1_a e 4_a diminuiu com o

aumento do número de varrimentos devido à diminuição da área disponível da superfície de eléctrodo de trabalho, causada pela adsorção dos produtos de oxidação da sanguinarina, contudo ainda foi possível detectar os picos 2_a e 3_a .

Noutra experiência foram registados dois voltamogramas de DP sucessivos numa solução de $100 \mu\text{M}$ de sanguinarina em $0,1 \text{ M}$ tampão fosfato $\text{pH} = 7,0$,

Figura 7.16. Neste caso, a oxidação da sanguinarina ocorreu em apenas três etapas.

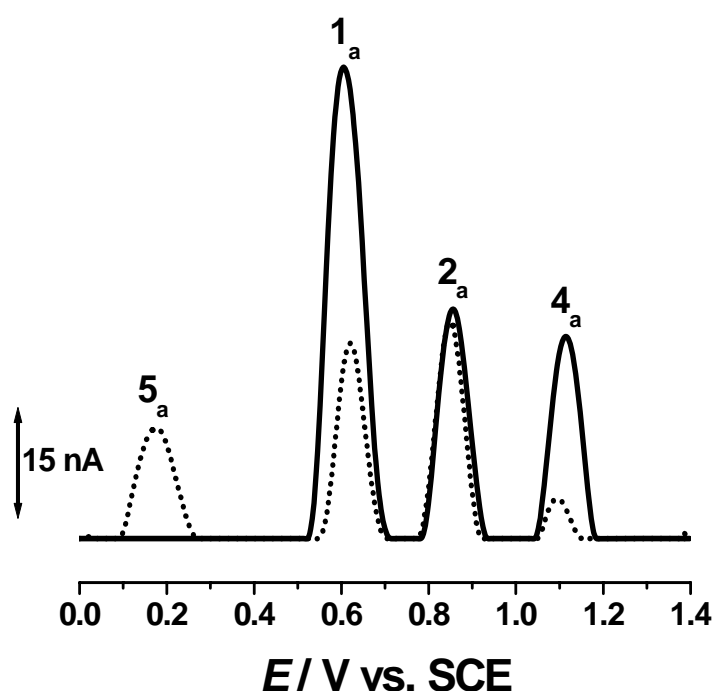


Figura 7.16 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos em solução de $100 \mu\text{M}$ de sanguinarina em $0,1 \text{ M}$ tampão fosfato $\text{pH} = 7,0$; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

No primeiro varrimento de DP foram observados os picos 1_a a $E_{\text{pa}}^1 = +0,61 \text{ V}$, 2_a a $E_{\text{pa}}^2 = +0,86 \text{ V}$ e 4_a a $E_{\text{pa}}^4 = +1,09 \text{ V}$. No varrimento seguinte apareceu apenas um novo pico de oxidação 5_a a $E_{\text{pa}}^5 = +0,19 \text{ V}$. Novamente, a corrente dos picos 1_a , 2_a e 4_a diminuiu gradualmente com o número de varrimentos, devido à diminuição da área

disponível da superfície do eléctrodo e à adsorção dos produtos de oxidação da sanguinarina.

Para determinar a adsorção dos produtos de oxidação da sanguinarina na superfície do GCE, ao fim de vários voltamogramas de DP registados na solução de sanguinarina o eléctrodo foi retirado, lavado com água desionizada, e transferido para o electrólito de suporte. No voltamograma registado nestas condições ocorrem somente os picos de oxidação 5_a e 6_a.

A oxidação electroquímica da sanguinarina foi estudada numa ampla gama de pH. Os voltamogramas de DP, **Figura 7.17**, foram registados em soluções de 100 µM de sanguinarina em diferentes soluções de electrólito de suporte de força iónica 0,1 M.

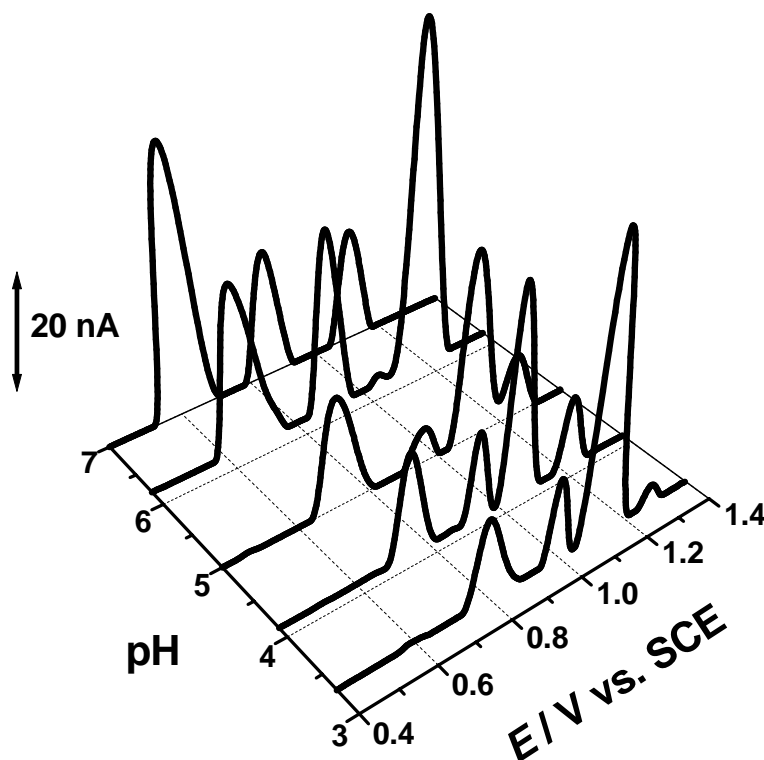


Figura 7.17 Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos numa solução de 100 µM de sanguinarina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

Para $\text{pH} < 2,0$ e $\text{pH} > 8,0$ não ocorreu nenhum pico de oxidação, mesmo quando foram utilizadas concentrações elevadas de sanguinarina, mostrando que a sanguinarina não é oxidável nessas condições. Para o $\text{pH} = 2,0$ e $\text{pH} = 8,0$ foram observados apenas os picos de oxidação 2_a e 3_a .

Para $3,3 \leq \text{pH} \leq 7,0$, ocorreram quatro picos de oxidação, 1_a , 2_a , 3_a e 4_a , e os seus valores de potencial diminuíram com o aumento do pH do electrólito de suporte. A dependência foi sempre linear, como está mostrado na **Figura 7.18**.

A inclinação das rectas é de 60 mV por unidade de pH e mostra que todos os processos de oxidação da sanguinarina ocorrem com a transferência de mesmo número de electrões e protões [238]. Considerando a largura a meia altura do pico de $\sim 50 \text{ mV}$, é possível concluir que a oxidação da sanguinarina ocorre com a transferência de dois electrões e dois protões.

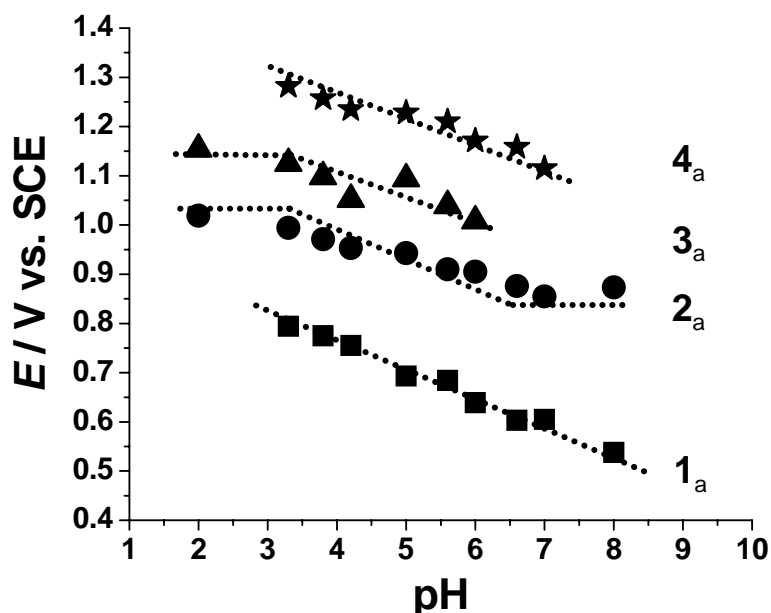


Figura 7.18 Gráfico da variação com pH do: (■) E_{pa}^1 do pico 1_a , (●) E_{pa}^2 do pico 2_a , (▲) E_{pa}^3 do pico 3_a e (★) E_{pa}^4 do pico 4_a .

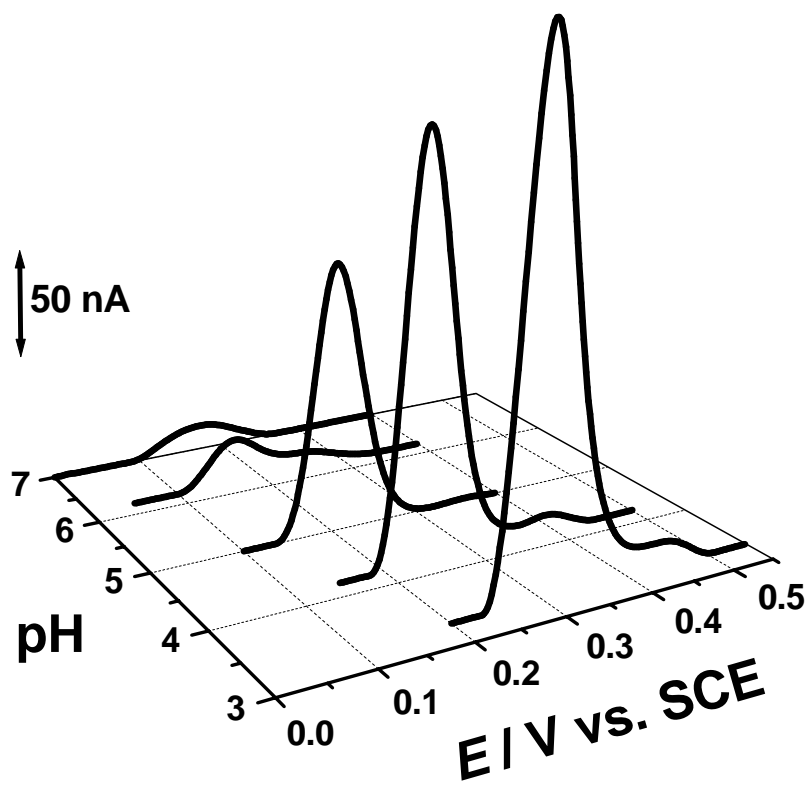
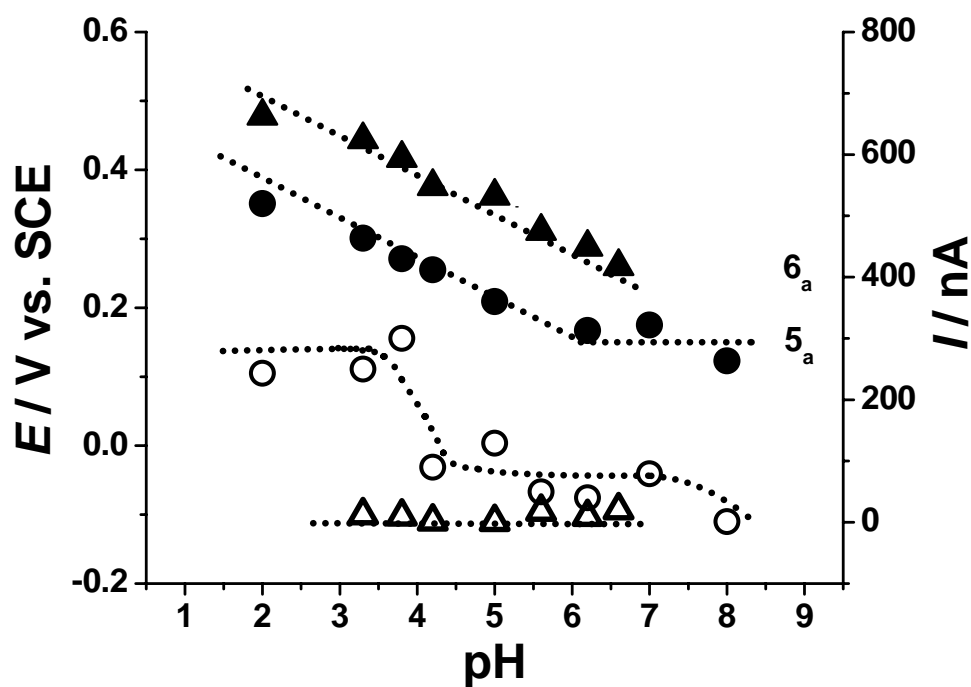
A**B**

Figura 7.19 (A) Segundo voltamograma de DP com correcção de linha de base, obtido em solução de 100 μ M de sanguinarina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

(B) Gráfico da variação com pH do E_{pa} e (O) I_{pa} do pico 5_a e (▲) E_{pa} e (△) I_{pa} do pico 6_a.

Para soluções de electrólito de suporte com $\text{pH} < 3,3$ e $\text{pH} > 7,0$, o potencial de oxidação do pico 2_a é independente do pH . Do mesmo modo, para electrólitos de suporte com $\text{pH} < 3,3$ o pico 3_a é também independente do pH . Este comportamento é devido aos processos químicos de protonação/desprotonação da sanguinarina, estando relacionado com os pK_a 's dos vários grupos da molécula.

A oxidação electroquímica dos produtos de oxidação da sanguinarina adsorvidos na superfície do GCE foi também estudada para diferentes valores de pH , utilizando voltametria de DP. Dois voltamogramas sucessivos foram registados numa solução de $100 \mu\text{M}$ de sanguinarina em diferentes electrólitos de suporte, e o segundo varrimento para cada electrólito está apresentado na **Figura 7.19A**.

Os picos 5_a e 6_a são dependentes do pH e os seus potenciais de oxidação diminuíram linearmente com o aumento do valor do pH do electrólito de suporte, **Figura 7.19B**. Em ambos os casos, a inclinação das rectas foi de 60 mV por unidade de pH , o que significa que o número de protões transferidos durante a oxidação dos produtos da oxidação da sanguinarina é igual ao número de electrões.

Para $\text{pH} > 6$, o potencial do pico 5_a é independente do pH , indicando um mecanismo que envolve apenas dois electrões e nenhum protão, devido a uma desprotonação química do produto da oxidação da sanguinarina.

A corrente do pico 6_a foi praticamente constante ao longo de toda a gama de pH estudada, enquanto que a corrente do pico 5_a apresentou um máximo no intervalo de pH entre $2,0$ e $4,2$. Para pH s superiores a $4,2$, a corrente do pico 5_a diminuiu rapidamente, ficando constante para $\text{pH} > 5,0$, **Figura 7.19B**.

7.3.3 Voltmetria de onda quadrada

Os voltamogramas de SW foram registados numa solução de 200 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, **Figuras 7.20 e 7.21**.

No primeiro varrimento voltamétrico observaram-se três picos, 1_a , 2_a e 4_a , **Figura 7.20**. O pico 1_a apresentou um perfil alargado, indicando a ocorrência de duas reacções consecutivas de transferência de carga, os picos $1_a'$ e $1_a''$. A presença dos picos $1_a'$ e $1_a''$ pode ser explicada através da diferente morfologia de adsorção da sanguinarina no GCE, que bloqueiam a sua superfície.

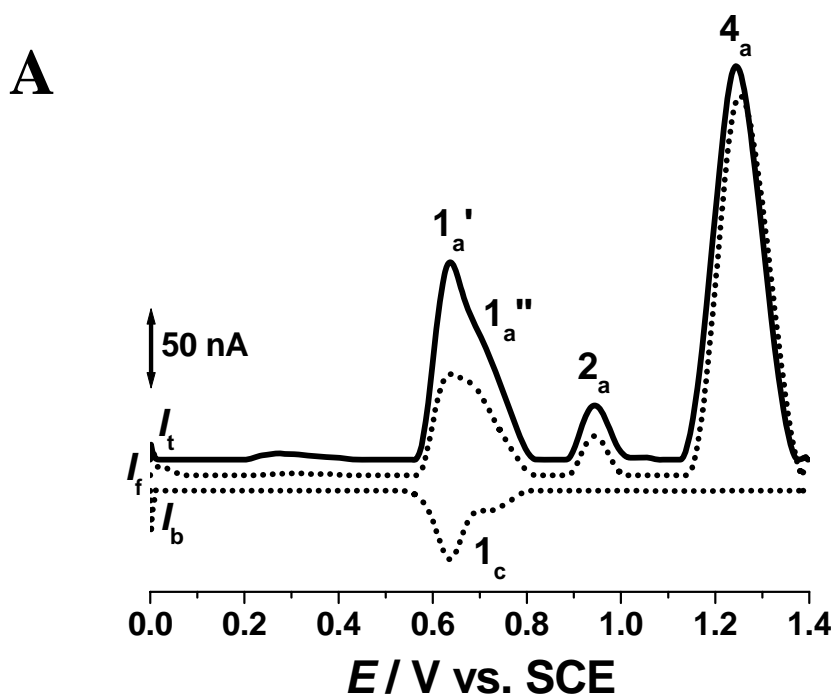


Figura 7.20 Primeira voltamograma de SW com correcção de linha de base, obtida numa solução de 100 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7.0: amplitude de pulso de 50 mV, I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

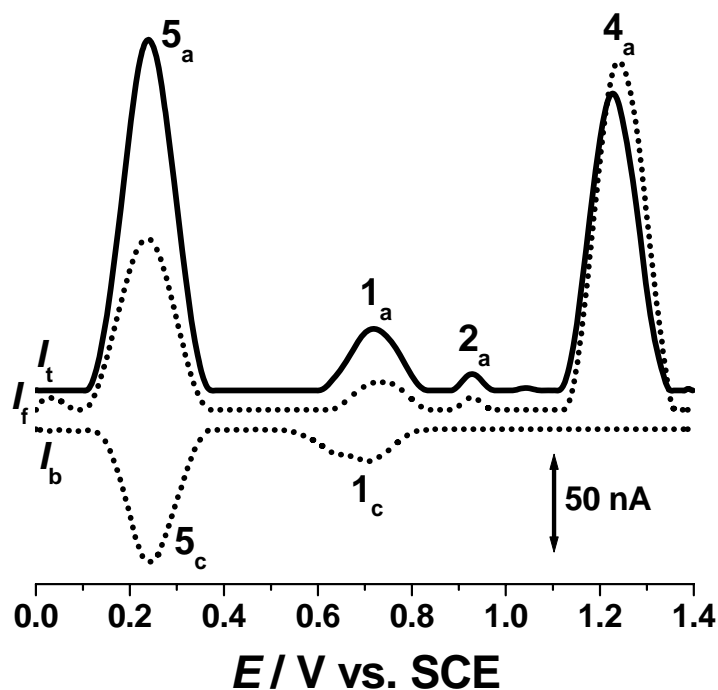


Figura 7.21 Segundo voltamograma de SW com correcção de linha de base, obtida numa solução de 100 μM de sanguinarina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: amplitude de pulso de 50 mV, I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Na componente inversa da corrente total do pico 1_a ocorreram dois novos picos catódicos, $1_c'$ e $1_c''$. Os valores de potencial destes picos catódicos são semelhantes aos dos picos anódicos, no entanto as suas correntes são inferiores, o que permite afirmar que o processo redox da sanguinarina correspondente ao par de picos $1_a - 1_c$ é quase-reversível.

Por outro lado, as componentes directa e inversa da corrente total do segundo voltamograma de SW, **Figura 7.21**, confirmaram a oxidação reversível do produto de oxidação da sanguinarina, o pico 5_a , uma vez que o valor de potencial e a corrente das duas componentes apresentaram valores semelhantes.

7.3.4 Mecanismo de oxidação

De novo foram comparados os resultados voltamétricos obtidos para a sanguinarina, e os mecanismos de oxidação dos compostos queleritrina, MDA, MDMA e berberina [4, 93-96], permitindo concluir que o pico 1_a da sanguinarina corresponde à oxidação do anel dioximetileno encontrado na proximidade do anel D, **Figura 7.22**.

O pico 2_a ocorre para um potencial mais positivo devido à remoção de electrões da dupla ligação do anel D, levando à desmetilação da sanguinarina e à formação de um derivado de catecolamina, que sofre oxidação reversível, o pico 5_a, levando à formação duma espécie de *orto*-quinona.

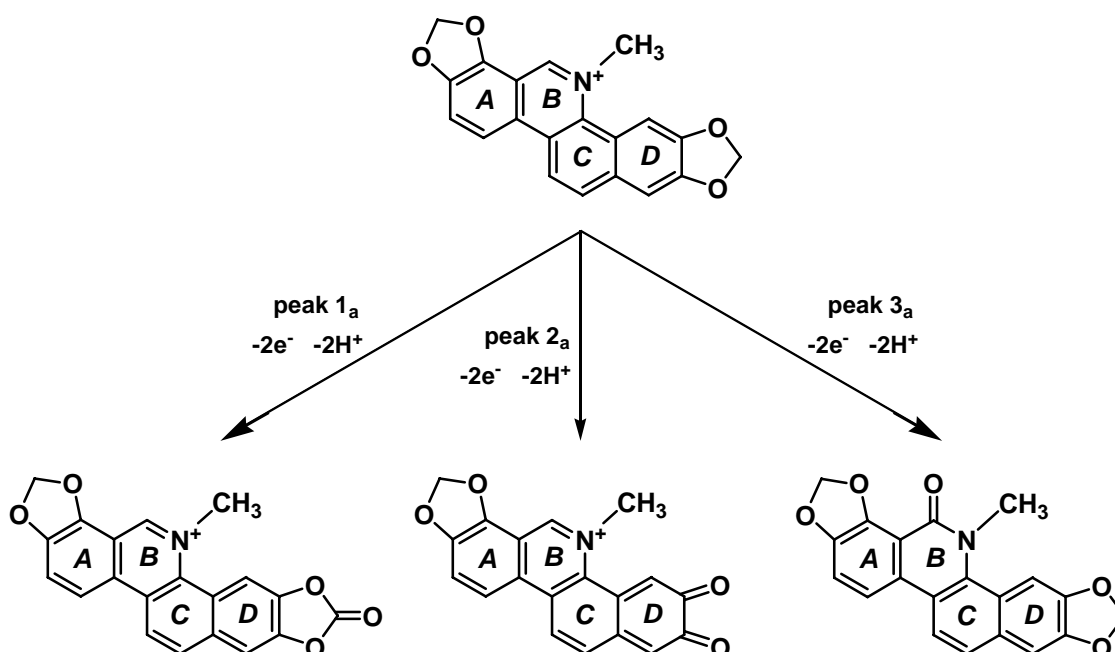


Figura 7.22 Mecanismo de oxidação da sanguinarina.

O pico 3_a está associado com a perda de electrões da amina terciária do anel B, através de um processo que leva à formação de oxosanguinarina [100]. Todavia, o pico 3_a não ocorre para pH > 7,0, devido à hidrólise química da sanguinarina em meios alcalinos, processo semelhante a outros alcalóides [99, 151].

O pico de oxidação 4_a está associado com a remoção de electrões da dupla ligação do anel A da sanguinarina, o que leva à desmetilação do anel secundário de metilenodioxí da sanguinarina e à formação de quinina, que, por sua vez, sofre uma oxidação reversível, o pico 6_a.

7.4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que a berberina e a sanguinarina, alcalóides com um amplo espectro de efeitos biológicos, sofrem oxidação no GCE.

A oxidação electroquímica da berberina e da sanguinarina foi investigada por voltametria cíclica, de DP e de SW, numa ampla gama de pH. As experiências de voltametria cíclica mostraram que os seus processos de oxidação são controlados pela difusão e ocorrem num mecanismo complexo com transferência de electrões e prótons.

Em meio ácido, a oxidação da berberina ocorre em três passos consecutivos de transferência de carga, enquanto que em meio neutro e alcalino ocorrem apenas dois processos de oxidação. De maneira semelhante, em meio ácido a oxidação da sanguinarina ocorre em quatro passos de transferência de carga e em meio alcalino em três passos.

Para todos os electrólitos de suporte estudados, foram também caracterizados os produtos de oxidação da berberina e da sanguinarina, que sofrem reacções redox reversíveis.

Tomando em consideração os resultados obtidos para berberina e sanguinarina apresentados ao longo deste capítulo e os resultados obtidos com moléculas com estruturas semelhantes, foram determinados os centros electroactivos e propostos os mecanismos redox da berberina e da sanguinarina, o que permite uma melhor compreensão dos efeitos biológicos destes alcalóides.

Capítulo 8

Estudo voltamétrico da tirosina, triptofano e histidina

8.1 INTRODUÇÃO

Um dos objectivos deste trabalho foi estudar o comportamento electroquímico das proteínas e dos aminoácidos que entram na sua constituição. Neste contexto, foram investigados os aminoácidos alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina e valina mas não mostraram electroactividade nos GCE e BDDE. As propriedades de transferência de carga e os mecanismos de oxidação dos aminoácidos tirosina, triptofano e histidina, **Figura 8.1**, são apresentadas [1, 3].

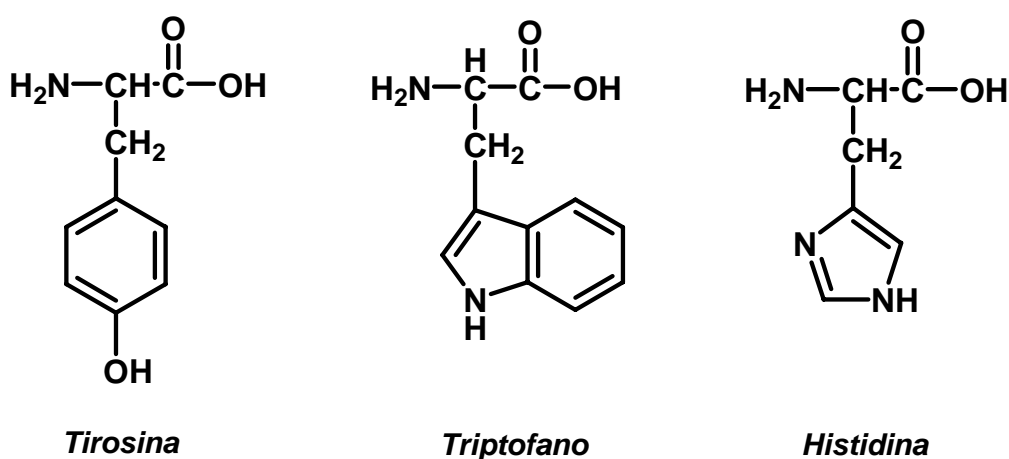


Figura 8.1 Estrutura química da tirosina, do triptofano e da histidina.

A tirosina é um aminoácido não essencial sintetizado nos organismos a partir da fenilalanina [152] envolvido na estrutura de quase todas as proteínas no corpo. A tirosina está implicada na síntese da melanina e tem uma grande importância no funcionamento dos órgãos responsáveis com a regulação de várias hormonas, incluindo as glândulas supra-renais, tiróide e pituitária [155]. Além da sua importância na estrutura das proteínas, a tirosina é um precursor de muitos neurotransmissores, como a dopamina, norepinefrina e epinefrina [152, 154].

O triptofano é um aminoácido aromático essencial, que não é sintetizado pelo organismo, pois a sua presença está relacionada com a nutrição. É utilizado pelo cérebro juntamente com outros compostos para produzir a serotonina. Devido ao átomo de nitrogénio da sua cadeia lateral, o triptofano é mais reactivo do que a fenilalanina, mas menos reactivo do que a tirosina [154].

A histidina é um dos aminoácidos essenciais para os organismos humanos e os outros mamíferos. O grupo imidazol da histidina está envolvido nas ligações dos grupos prostéticos e encontra-se na maioria dos sítios ativos de enzimas [155].

Os três aminoácidos, tirosina, triptofano e histidina, contêm grupos aromáticos que são muito sensíveis ao ataque oxidativo das espécies ROS e RNS. A oxidação dos resíduos de tirosina, de triptofano e de histidina pelos radicais hidróxilo leva à formação de vários produtos de oxidação, e a natureza dos seus produtos de oxidação finais e dos seus intermediários dependem das espécies oxidantes e das condições em que as reacções ocorrem [15].

8.2 TIROSINA E POLI-TIROSINA

O comportamento electroquímico da tirosina foi estudado utilizando voltametria de DP no GCE, em soluções de electrólitos de suporte com diferentes valores de pH, e o seu mecanismo de oxidação foi determinado. A influência da ligação peptídica e da superfície do eléctrodo no mecanismo de oxidação da tirosina, quando presente numa cadeia polipeptídica foi investigada.

8.2.1 Tirosina

O voltamograma de DP obtido numa solução de 25 μM de tirosina (Y) em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, entre os limites de potencial mínimo de 0,00 V e máximo de + 1,20 V, mostrou um pico de oxidação P_Y a $E_p = + 0,65$ V.

No segundo varrimento registado nas mesmas condições e sem limpar a superfície de eléctrodo, apareceu um novo pico de oxidação P'_Y a um potencial menos positivo. Este pico é devido à oxidação do produto de oxidação da tirosina formado na superfície do GCE durante o primeiro varrimento, **Figura 8.2** sendo observada a diminuição da corrente do pico P_Y causada pela adsorção de produto de oxidação e diminuição da área disponível do eléctrodo.

Os voltamogramas de DP registados com o GCE em soluções de 25 μM de tirosina em electrólitos de suporte com pH entre 1 e 12 mostraram que o processo de oxidação da tirosina ocorre numa única etapa, pico P_Y , **Figura 8.3**.

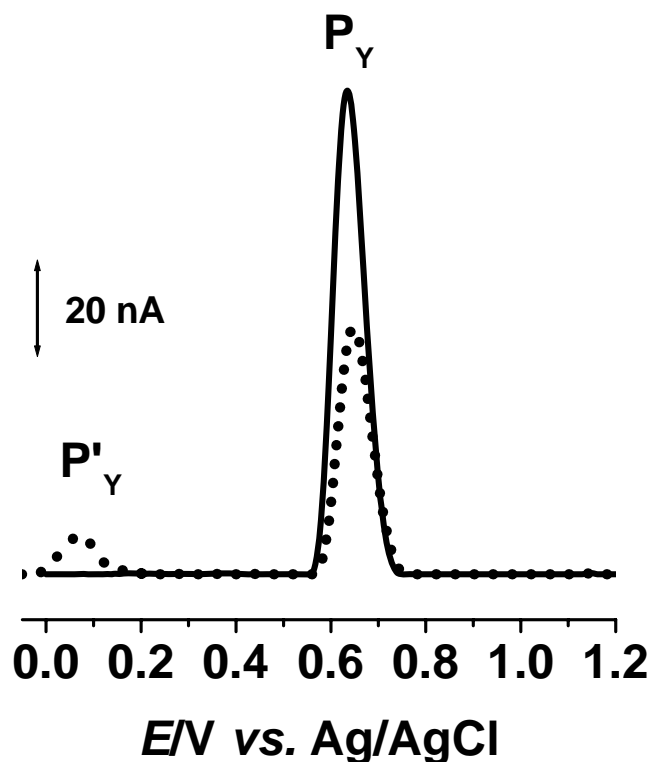


Figura 8.2 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos no GCE, numa solução de 25 μM de tirosina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

O potencial de oxidação da tirosina é dependente do pH do electrólito de suporte. A dependência é linear e a inclinação da recta correspondente é de 60 mV por unidade de pH, **Figura 8.4**. Isto significa que a oxidação da tirosina ocorre com a transferência do mesmo número de electrões e de protões. A largura a meia largura do pico P_Y , $W_{1/2} \sim 100$ mV, permite concluir que a oxidação de tirosina ocorre com transferência de um electrão e um protão [238].

Voltamogramas de DP foram sucessivamente registados nas mesmas soluções e sem limpar a superfície de eléctrodo. O pico P'_Y correspondente à oxidação do produto de oxidação da tirosina foi observado em todos os electrólitos estudados, **Figura 8.5A**.

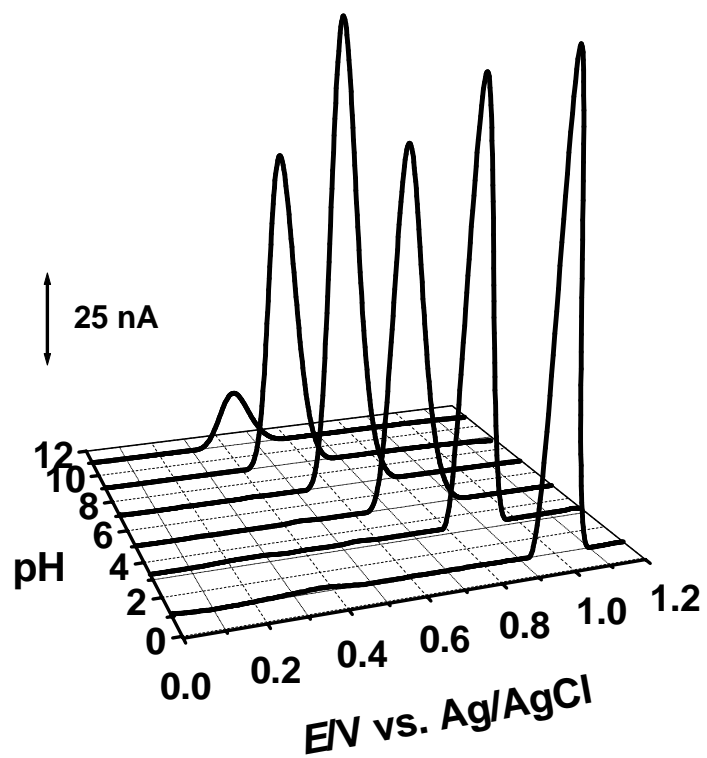


Figura 8.3 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos em solução de 25 μM de tirosina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

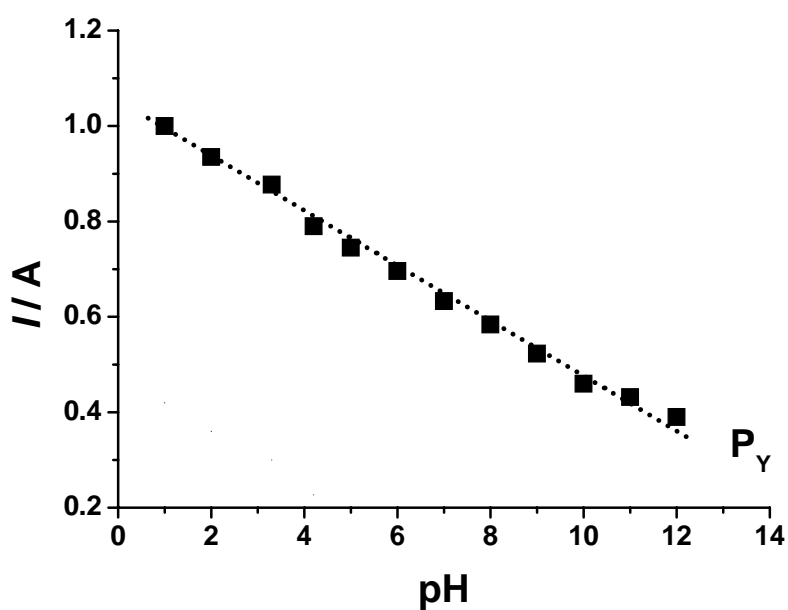


Figura 8.4. Gráfico da variação com pH do (■) E_p do pico P_Y .

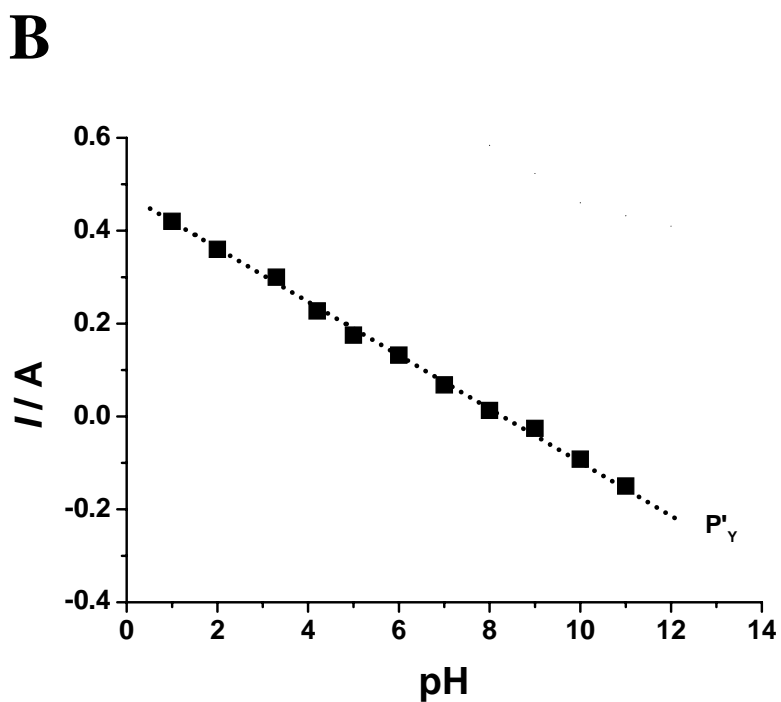
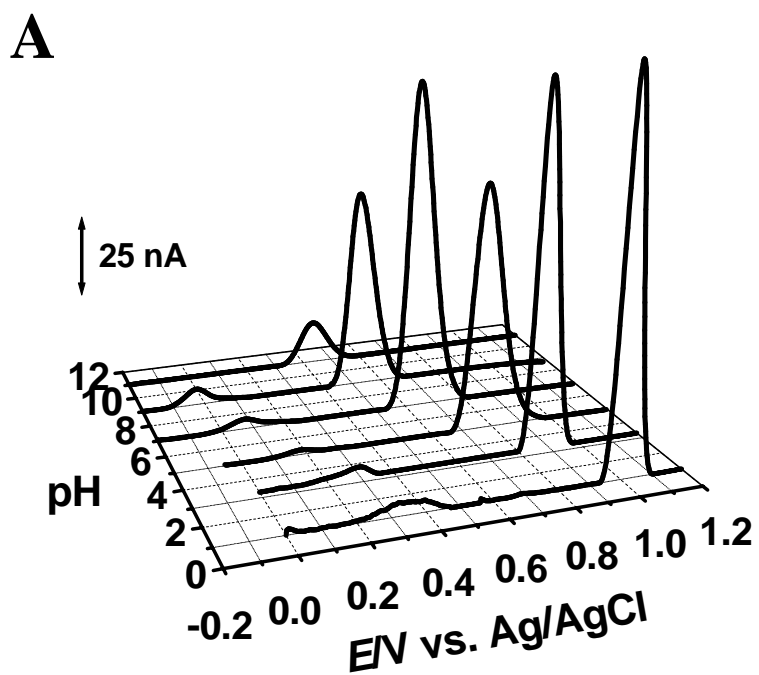


Figura 8.5 (A) Segundo varrimento de DP com correcção de linha de base, obtido em solução de 25 μM de tirosina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação com pH do (■) E_p do pico P'_Y .

O potencial do pico P'_Y é dependente do pH e a inclinação da recta é de 60 mV por unidade de pH, **Figura 8.5B**. Isto significa que a oxidação do produto de oxidação da tirosina ocorre com a transferência do mesmo número de electrões e de protões [238].

Considerando que a largura a meia altura do pico P'_Y varia entre 55 e 65 mV, é possível concluir que o mecanismo de oxidação do produto de oxidação da tirosina envolve a transferência dos dois electrões e dois protões.

Alem disso, em todos os electrólitos estudados foi observada a diminuição da corrente do pico P_Y causada pela adsorção do produto de oxidação e diminuição da área disponível do eléctrodo.

8.2.2 Poli-tirosina

A influência da ligação péptidica e da superfície de eléctrodo no mecanismo de oxidação da tirosina foi investigada em soluções saturadas de poli-tirosina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0. Deste modo foi estudado o comportamento electroquímico da poli-tirosina nas superfícies de GCE e BDDE, utilizando voltametria de DP. **Figura 8.6**. Devido à sua baixa solubilidade em solução aquosa, a poli-tirosina foi adicionada directamente em electrólito de suporte em célula electroquímica.

Os voltamogramas registados com o GCE, **Figura 8.6A**, e com o BDDE, **Figura 8.6B**, mostraram que para os dois eléctrodos utilizados, a poli-tirosina segue um mecanismo de oxidação semelhante à molécula de tirosina. A única diferença entre os dois eléctrodos foi observada nas correntes dos picos que é devido à uma área superior da superfície do BDDE, quando comparado com o GCE.

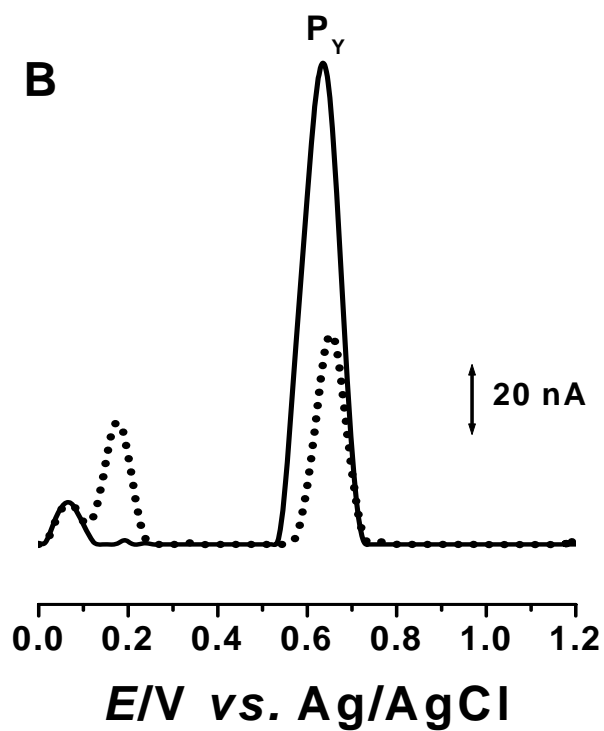
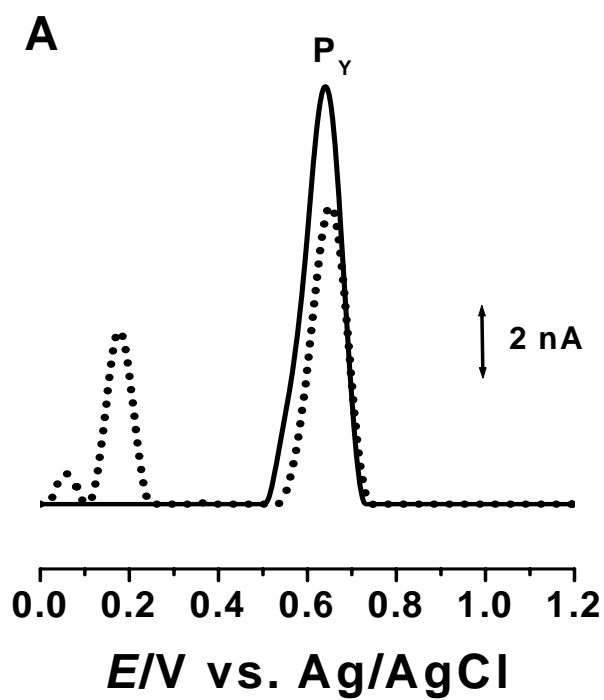


Figura 8.6 Voltamogramas de DP com correção de linha de base obtidos no (A) GCE e (B) BDDE, em solução saturada de poli-tirosina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

8.2.3 Mecanismo de oxidação

O processo de oxidação da tirosina é explicado por um mecanismo eletroquímico-químico, **Figura 8.7**, semelhante aos mecanismos de oxidação do fenol e dos derivados de fenol *para*-substituídos apresentados no *Capítulo 4*.

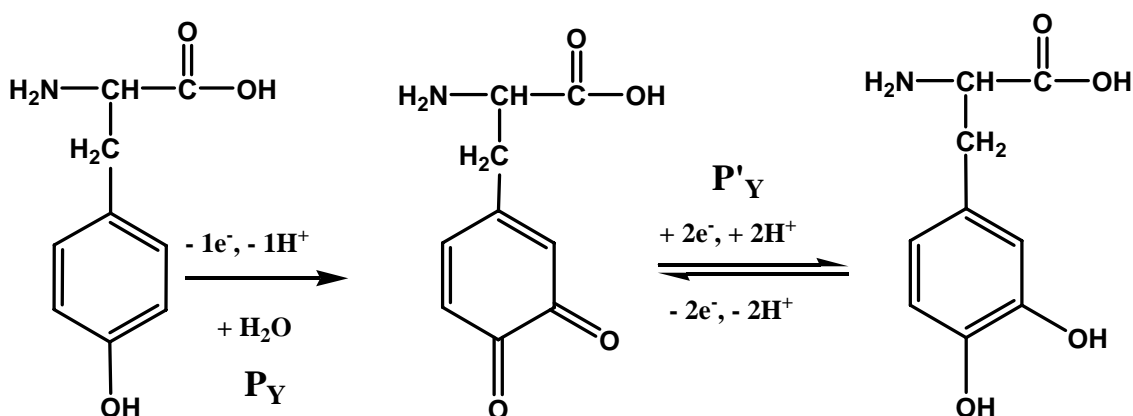


Figura 8.7 Esquema do mecanismo de oxidação da tirosina proposto.

No processo de oxidação da tirosina é transferido um electrão, seguido pela desprotonação do grupo hidróxilo, que leva à produção de um radical fenóxido estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, e à formação dum produto de oxidação que é, por sua vez, oxidado reversivelmente.

8.3 TRIPTOFANO E POLI-TRIPTOFANO

As reacções redox do triptofano a superfície na GCE foram estudadas utilizando voltametria de DP em electrólitos de suporte com diferentes pHs. A influência da ligação péptida e da superfície de eléctrodo no mecanismo de oxidação do triptofano foi investigada, através do estudo electroquímico do poli-triptofano.

8.3.1 Triptofano

No primeiro voltamograma de DP registado numa solução de 25 μM de triptofano (W) em 0,1 tampão fosfato pH = 7,0 foram observados dois picos de oxidação: o pico P^1_{W} a $E_p = +0,65 \text{ V}$ e o pico P^2_{W} a $E_p = +1,05 \text{ V}$.

No voltamograma seguinte registado na mesma solução e sem limpar a superfície de GCE apareceram a potenciais menos positivos dois novos picos de oxidação, P^3_{W} e P^4_{W} . Estes picos são devido à oxidação dos produtos de oxidação do triptofano formados na superfície do GCE durante o primeiro varrimento, **Figura 8.8**.

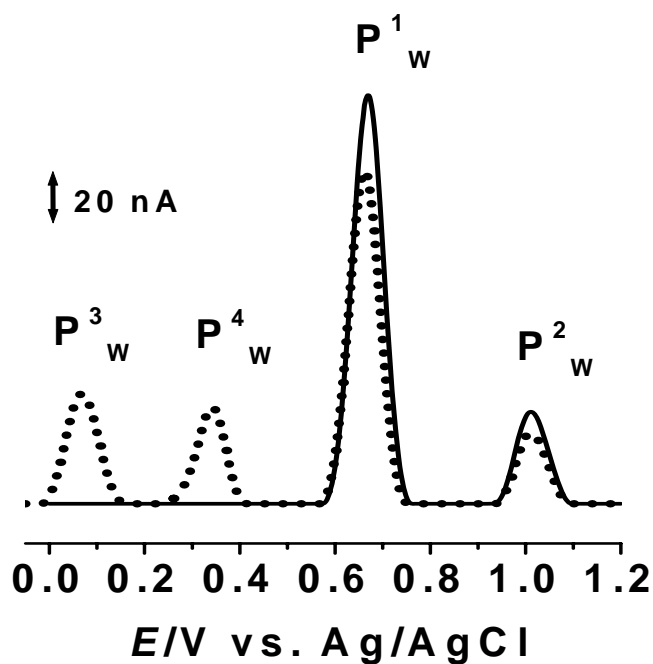


Figura 8.8 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos no GCE numa solução de 25 μM de triptofano em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

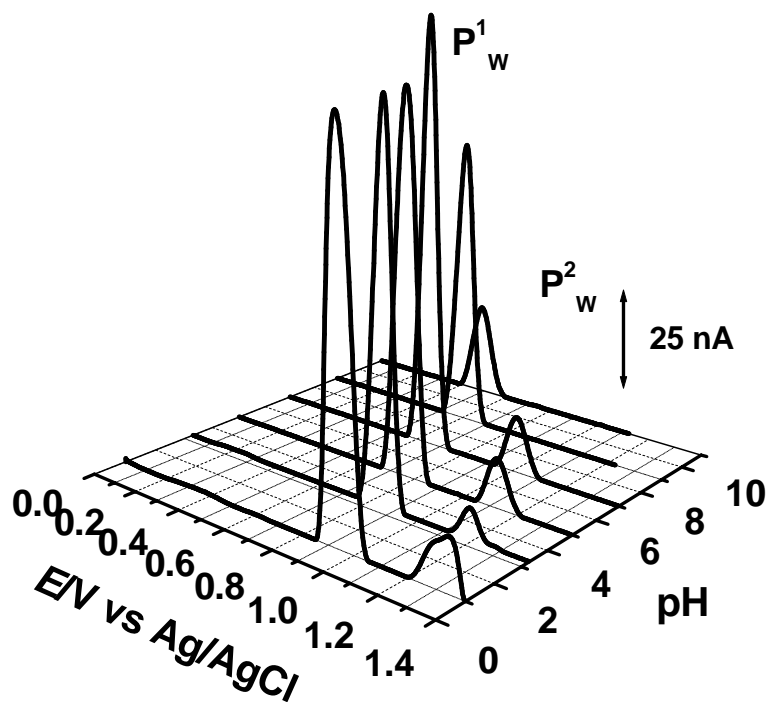


Figura 8.9 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos em solução de 25 μM de triptofano em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

O comportamento electroquímico do triptofano foi estudado através de voltametria de DP em electrólitos com força iónica de 0,1 M e pH entre 1 e 12. Os voltamogramas registados em soluções de 25 μM de triptofano mostraram em todos os electrólitos com $\text{pH} \leq 8$ a ocorrência de duas reacções consecutivas de transferência de electrão, os picos P^1_w e P^2_w , **Figura 8.9**. Para electrólitos com $\text{pH} > 8$ ocorreu apenas o pico P^1_w . O potencial do primeiro pico de oxidação do triptofano, P^1_w , é dependente do valor de pH para todos os electrólitos estudados, seguindo a equação $E_p \text{ (V)} = 1,060 - 0,06 \text{ pH}$, **Figura 8.10**. Também, para $\text{pH} < 8$, o potencial do pico de oxidação P^2_w varia com pH. As inclinações das rectas, **Figura 8.10**, são de 60 mV por unidade de pH para os dois picos. Isto significa que os dois passos de oxidação do triptofano ocorrem com a transferência do mesmo número de electrões e de protões.

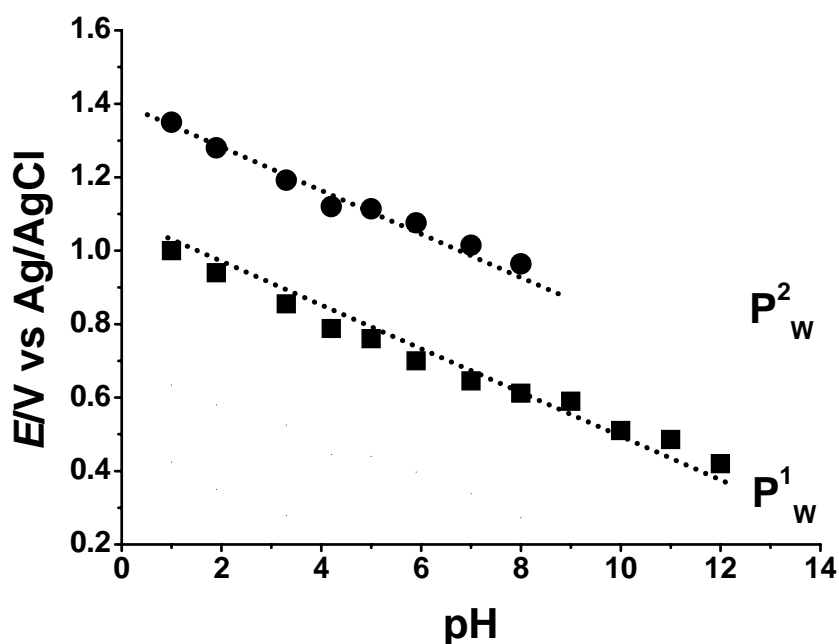


Figura 8.10. Gráfico da variação com pH do (■) E_p do pico P^1_w e (●) E_p do pico P^2_w .

Considerando que a largura a meia altura ($W_{1/2}$) dos picos P^1_w e P^2_w têm valores entre 100 mV e 110 mV em todos electrólitos de suporte estudados, é possível concluir que estes processos de oxidação ocorrem com a transferência de um electrão e um protão.

O comportamento electroquímico dos produtos de oxidação do triptofano foi também estudado. Para isso, foram registados dois voltamogramas de DP sucessivos numa solução de 25 μM de triptofano em electrólitos com $1 < \text{pH} < 8$ e o segundo varrimento para cada electrólito está apresentado na **Figura 8.11A**.

Os potenciais dos picos P^3_w e P^4_w são dependentes do pH, deslocando-se para valores menos positivos com o aumento do pH, **Figura 8.11B**. A inclinação das rectas de 60 mV e a largura a meia altura dos picos P^3_w e P^4_w encontrada entre 55 mV e 65 mV mostra que a oxidação dos produtos de oxidação do triptofano ocorre com a transferência de dois electrões e dois protões.

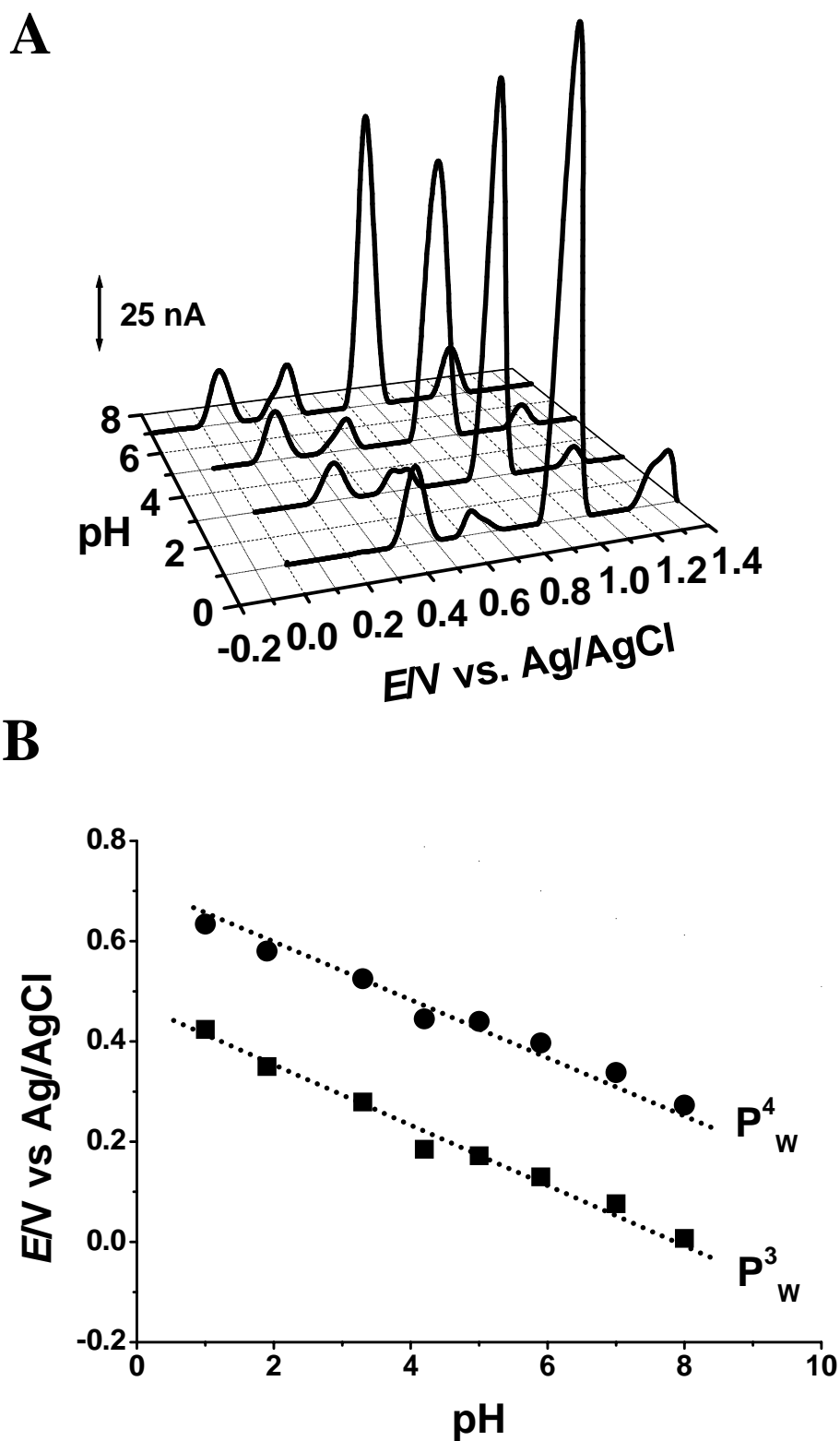


Figura 8.11 (A) Segundo voltamograma de DP com correcção de linha de base, obtidos em solução de 25 μM de triptofano em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH;

(B) Gráfico da variação com pH do (■) E_p do pico P_w^3 e (●) E_p do pico P_w^4 .

8.3.2 Poli-triptofano

A influência da ligação peptídica no mecanismo de oxidação do poli-triptofano foi estudada por voltametria de DP, utilizando o GCE e o BDDE, **Figura 8.12**. Como a solubilidade do poli-triptofano em solução aquosa é muito baixa, as soluções foram preparadas directamente na célula electroquímica.

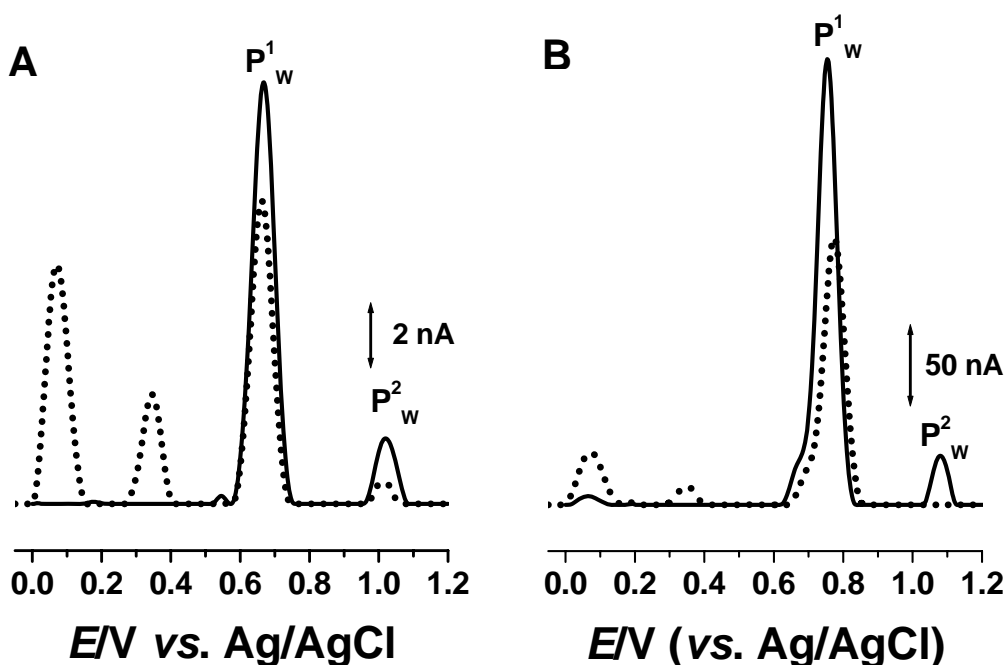


Figura 8.12 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos nos (A) GCE e (B) BDDE, numa solução saturada de poli-triptofano em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento.

O primeiro voltamograma de DP, registado numa solução saturada de poli-triptofano em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 na superfície de GCE, mostrou duas

reacções de transferência de electrão a $E_p = + 0,65 \text{ V}$ e $E_p = + 1,03 \text{ V}$, correspondentes aos picos de oxidação do triptofano, P^1_w e P^2_w , **Figura 8.12A**.

No voltamograma seguinte, registado nas mesmas condições e sem limpar a superfície de GCE, ocorreram dois novos picos para os mesmos potenciais de oxidação dos picos P^3_w e P^4_w do triptofano.

Por outro lado, utilizando o BDDE, **Figura 8.12B**, os picos de oxidação do poli-triptofano aparecerem para um potencial mais positivo ($\sim 100 \text{ mV}$) do que como o GCE, mas o mecanismo de oxidação foi semelhante.

Para os dois eléctrodos a oxidação ocorre em duas etapas com a formação de produtos electroactivos que adsorvem na superfície do eléctrodo.

8.3.3 Mecanismo de oxidação

Levando em consideração o comportamento electroquímico do triptofano e o mecanismo de oxidação dos derivados de indol com um substituinte no C3 apresentados no *Capítulo 6*, foi possível esclarecer os processos de oxidação do triptofano no GCE, **Figura 8.13**.

O primeiro passo da oxidação do triptofano ocorre no anel de pirrol e corresponde à formação de uma espécie de 2-oxi-indol. A oxidação seguinte leva à formação douma espécie 2,7-oxi-indol, **Figura 8.13**.

Deste modo, a primeira etapa, o pico P^1_w , corresponde à oxidação do C2 do anel de pirrol, seguida pela oxidação do anel de benzeno, o pico P^2_w , com a formação de um radical. A estabilização do radical formado por ataque nucleofílico da água leva à hidroxilação do carbono C7 do grupo indol do triptofano e à formação de produtos electroactivos. A oxidação desses produtos corresponde aos picos P^3_w e P^4_w .

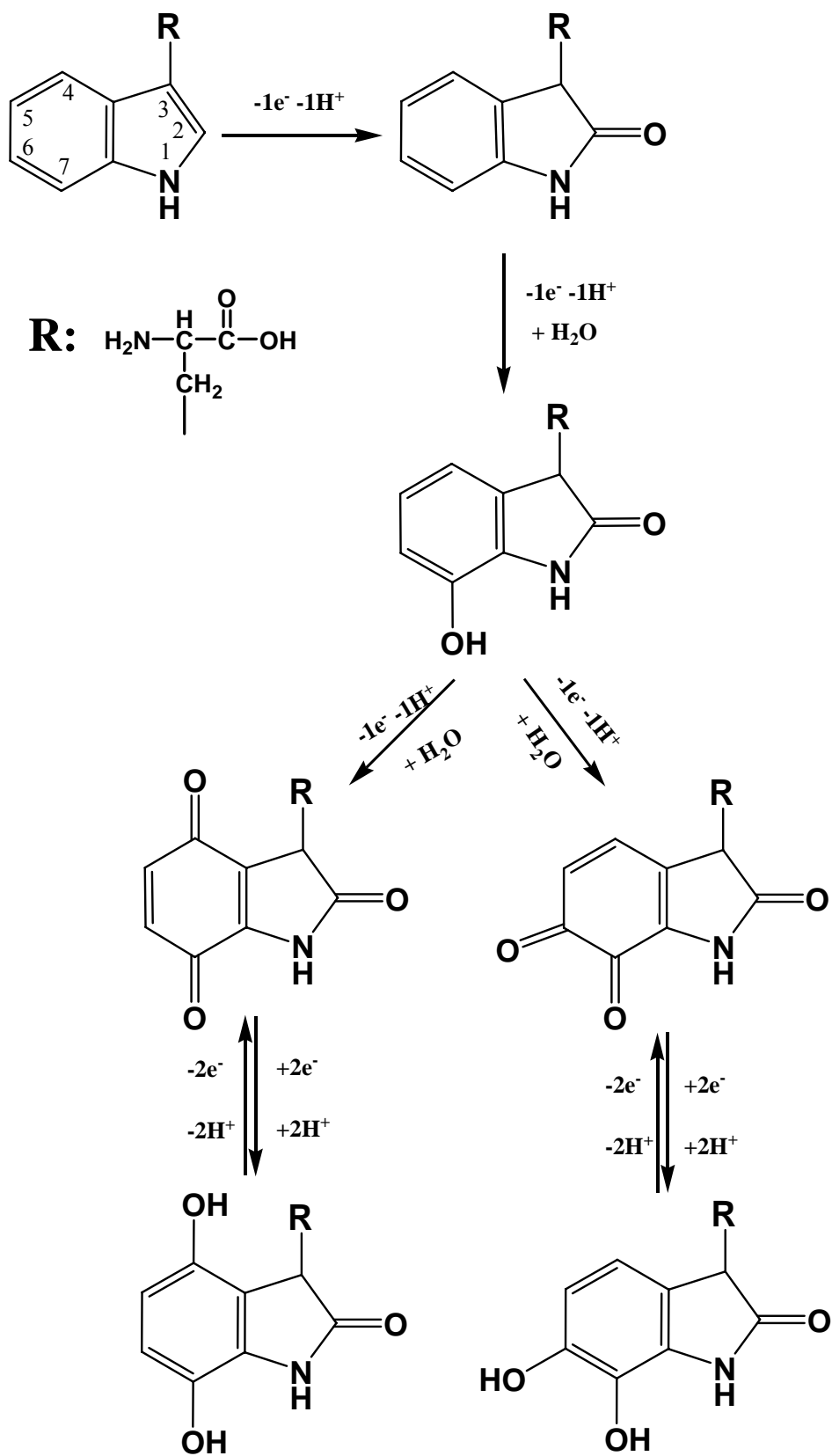


Figura 8.13 Esquema do mecanismo de oxidação proposto para o triptofano.

8.4. HISTIDINA

O comportamento electroquímico da histidina usando GCE e de BDDE foi estudado por voltametria cíclica e de DP, em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH, e o seu mecanismo de oxidação foi proposto.

8.4.1 Voltametria cíclica

As experiências de voltametria cíclica foram realizadas em soluções de 100 μM de histidina para GCE, **Figura 8.14**, e de histidina (H) para BDDE, **Figura 8.15**, em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0.

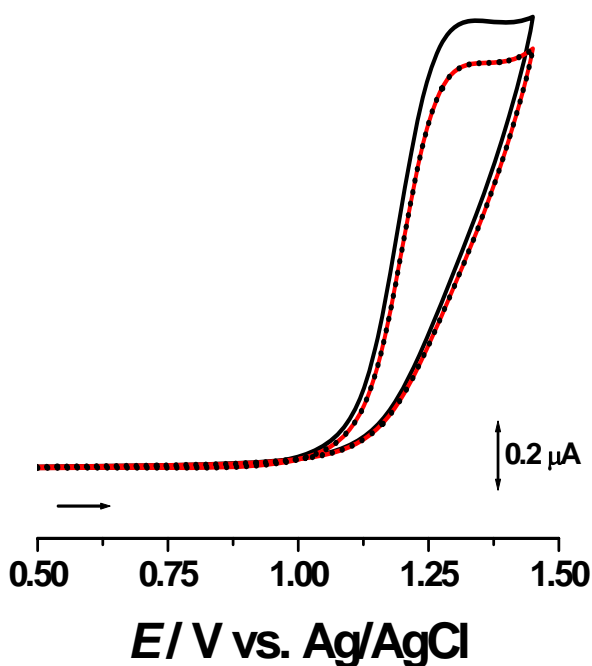


Figura 8.14 Voltamogramas cíclicos obtidos com o GCE numa solução de 175 μM de histidina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro, (•••) segundo e (---) terceiro varrimentos, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

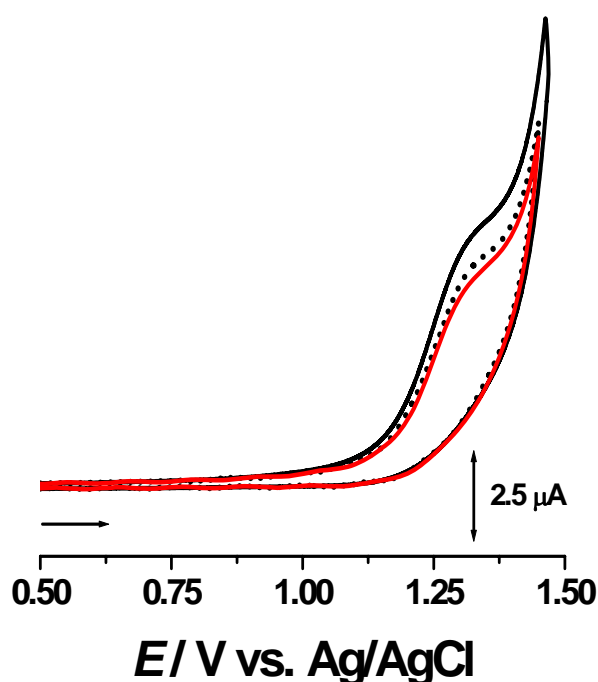


Figura 8.15 Voltamogramas cíclicos obtidos com o BDDE, numa solução de 100 μM de histidina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0; (—) primeiro, (•••) segundo e (—) terceiro varrimentos, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nestas condições, para os dois eléctrodos, a oxidação da histidina, ocorreu num único passo, o pico P_H , a um potencial de $E_p = + 1,25\text{V}$. No varrimento catódico não foi observado pico de redução, mostrando que o processo é irreversível.

No segundo voltamograma efectuado sem limpar a superfície do eléctrodo, o pico de oxidação da histidina ocorreu ao mesmo potencial e com a mesma corrente, o que significa que o produto de oxidação da histidina não é electroactivo e não adsorve na superfície do eléctrodo.

Experiências de voltametria cíclica foram também efectuadas em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH. Para $3 < \text{pH}$ e $\text{pH} > 9$, mesmo para concentrações elevadas de histidina e nenhuma resposta electroquímica foi obtida, mostrando que a histidina não é oxidável nestas condições.

8.4.2 Voltametria de impulso diferencial

Os voltamogramas de DP registados com o GCE numa solução de 100 μM de histidina em electrólitos de suporte com $5 < \text{pH} < 9$, mostraram características semelhantes às da voltametria cíclica. A oxidação ocorre numa única etapa e foi observado um pico de oxidação dependente do pH, **Figura 8.16**.

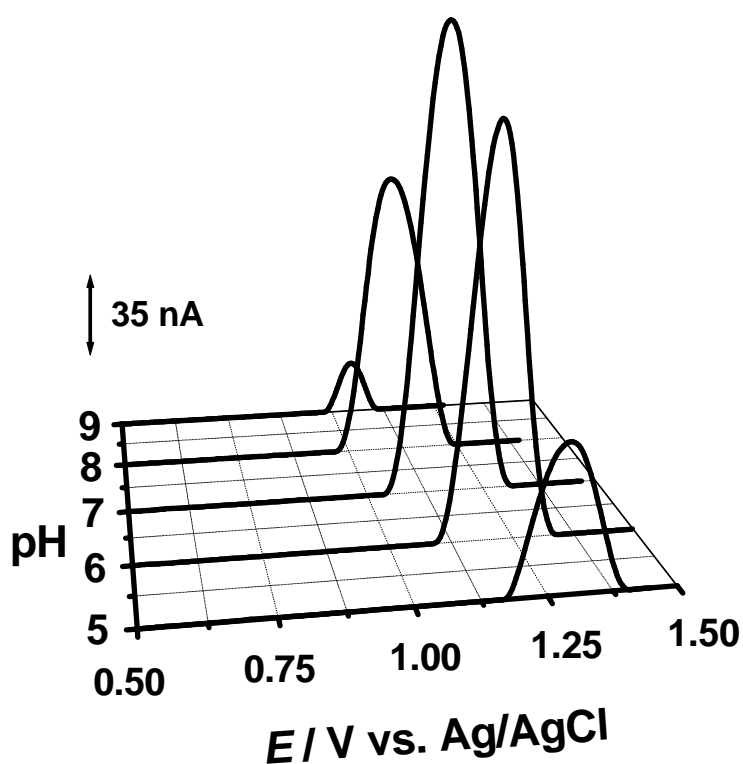


Figura 8.16 Voltamogramas de DP com correcção de linha de base, obtidos com o GCE, em soluções de 100 μM histidina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

O pico de oxidação P_H da histidina deslocou-se para valores menos positivos com o aumento do pH. A dependência é linear e a inclinação da recta de 60 mV por unidade de pH, **Figura 8.17**, mostra que a oxidação da histidina envolve o mesmo número de electrões e de protões.

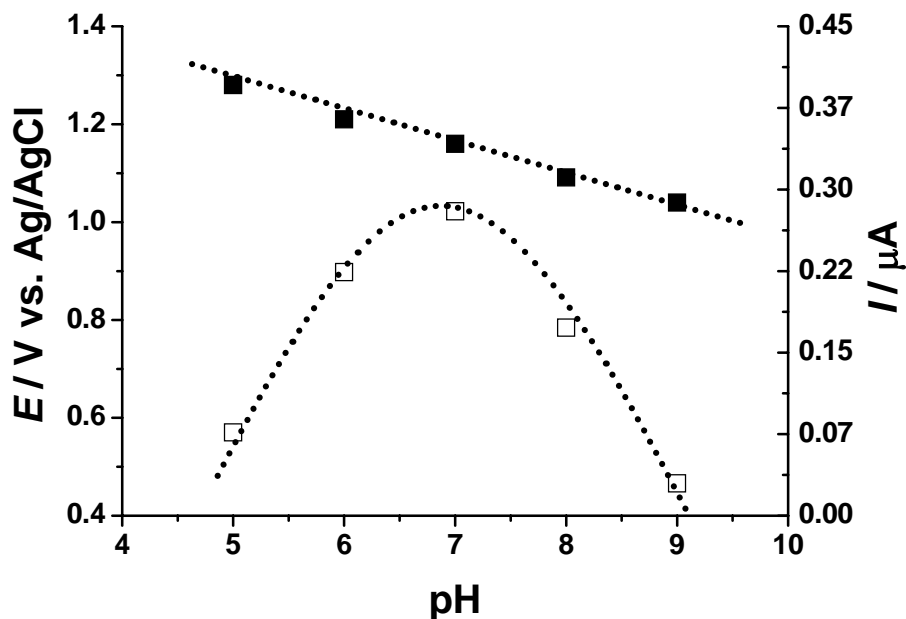


Figura 8.17 Gráfico da variação com o pH do (■) E_p e (□) I_p do pico P_H , em GCE.

A largura a meia altura do pico de oxidação é $W_{1/2} \sim 100$ mV em todos os electrólitos de suporte estudados, mostrando que o mecanismo de oxidação da histidina ocorre com a transferência de um electrão e um protão. A corrente do pico teve o valor mais elevado em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, e nenhum pico de oxidação foi observado nos voltamogramas registados em electrólitos com pH < 3 e pH > 9.

Numa experiência efectuada numa solução de 50 μ M histidina em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 usando o BDDE, **Figura 8.18A**, o pico de oxidação P_H ocorreu ao mesmo potencial que no caso do GCE, $E_p = + 1,17$ V, **Figura 8.18B**. O maior valor para a corrente registado no BDDE é devido às diferenças nas áreas da superfície dos dois eléctrodos. Registando voltamogramas sucessivos sem limpar as superfícies dos eléctrodos, o pico de oxidação apareceu ao mesmo potencial com a mesma corrente em ambos os casos. O mecanismo de oxidação da histidina não depende do material do eléctrodo e é o mesmo em GCE e BDDE.

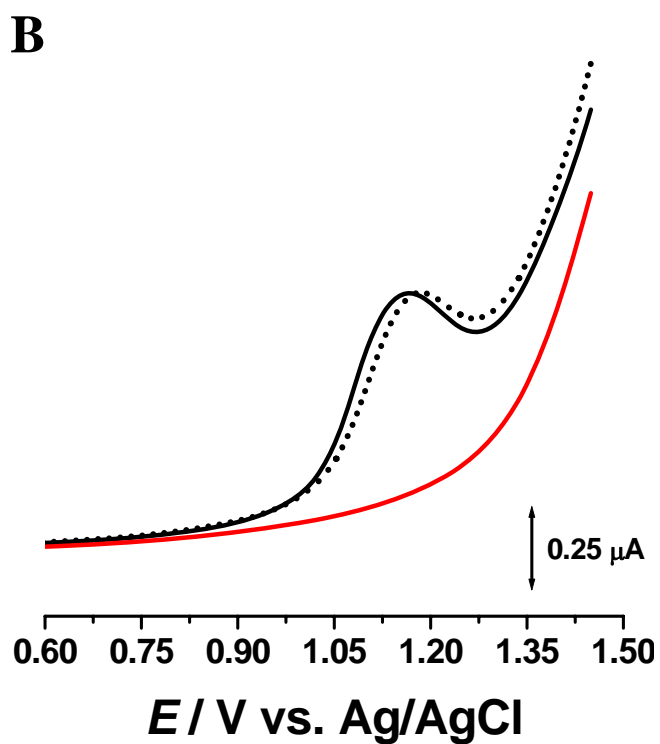
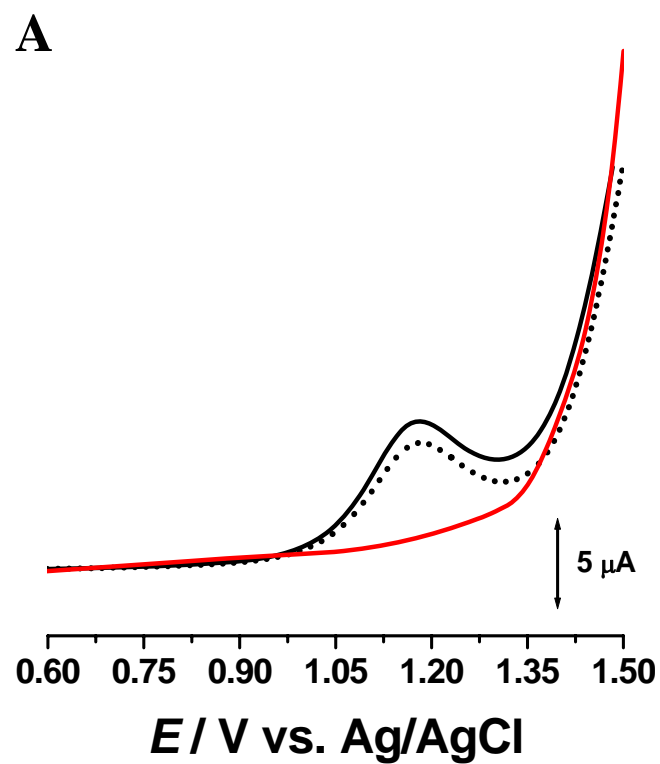


Figura 8.18 Voltamogramas de DP obtidos em soluções de histidina em (—) 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 a (A) BDDE e a (B) GCE; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

8.4.3 Mecanismo de oxidação

No intervalo $6 < \text{pH} < 9$, o grupo carboxilo da histidina está desprotonado, enquanto que o grupo amino está protonado e o anel de imidazol é neutro. A oxidação do grupo imidazol ocorre só entre estes valores de pH, através de um mecanismo que envolve a transferência de um electrão e um protão, com a formação de um radical instável e que pode existir em três formas isoméricas.

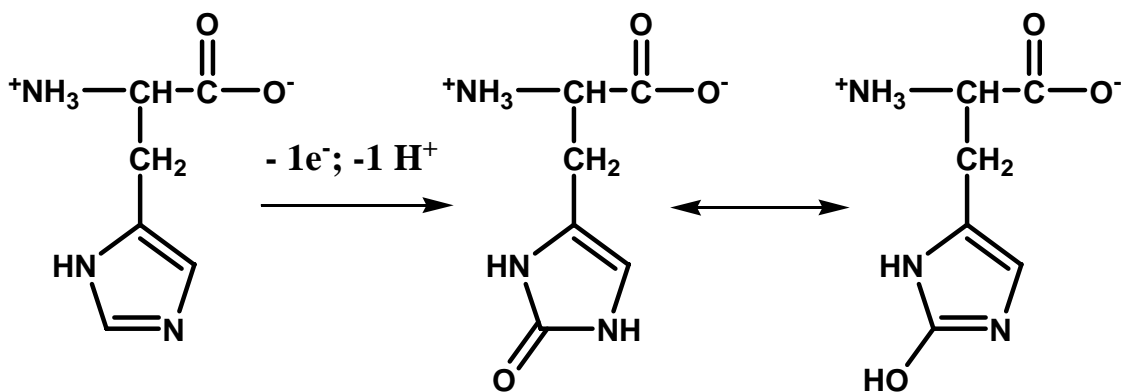


Figura 8.19 Esquema do mecanismo de oxidação electroquímica da histidina.

O ataque nucleofílico da água pode ocorrer na posição C2, C4 ou C5 e estabiliza o radical levando a sua hidroxilação. Contudo, o isómero mais estável, com mais baixa energia, envolve a posição C2 [60]. O mecanismo de oxidação da histidina para 2-oxohistidina está descrito na **Figura 8.19**.

8.5 CONCLUSÕES

O comportamento electroquímico da tirosina, do triptofano e da histidina foi estudado no GCE e no BDDE, em electrólitos de suporte com vários valores de pH.

A oxidação electroquímica da tirosina está relacionada com a oxidação do grupo fenol, envolvendo a formação dum radical fenóxido estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, que leva à formação dum produto de oxidação electroactivo. Foi também observado que as ligações peptídicas formadas entre as moléculas de tirosina (poli-tirosina) não modificam o seu mecanismo de oxidação. Além disso, para os dois eléctrodos utilizados, o CGE e o BDDE, a oxidação da tirosina e do seu produto de oxidação ocorreu para os mesmos potenciais, não depende do material do eléctrodo.

O triptofano sofre um processo de oxidação em dois passos. A primeira etapa corresponde à oxidação do carbono C2 do anelo pirrol, seguida pela hidroxilação na posição C7 do anel benzeno, que leva à formação de produtos electroactivos. Os produtos de oxidação adsorvem na superfície do eléctrodo e são oxidados reversivelmente. As experiências efectuadas em soluções de poli-triptofano mostraram que a ligação peptídica não altera o mecanismo de oxidação do triptofano. Embora na superfície de BDDE o poli-triptofano apresente o mesmo comportamento electroquímico, as etapas de oxidação ocorreram para potenciais mais positivos do que na superfície do GCE.

A oxidação da histidina segue mecanismos semelhantes nos dois eléctrodos, ocorrendo num só passo irreversível, que envolve a transferência de um electrão e um protão, e leva à formação de um radical instável, e ao ataque nucleofílico da água com a formação da 2-oxohistidina.

Capítulo 9

Estudo voltamétrico da cisteína e da metionina

9.1 INTRODUÇÃO

A cisteína, **Figura 9.1**, tem grande importância na estrutura das proteínas. Em proteínas extracelulares, os resíduos de cisteína estão frequentemente envolvidos em pontes de dissulfeto, onde dois resíduos de cisteína sendo oxidados para formar uma ligação covalente. Estas ligações servem principalmente para estabilizar a estrutura da proteína e têm um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas. Os resíduos de cisteína estão também envolvidos nos sítios activos de muitas proteínas ou na ligação de cofactores a grupos prostéticos [152, 155].

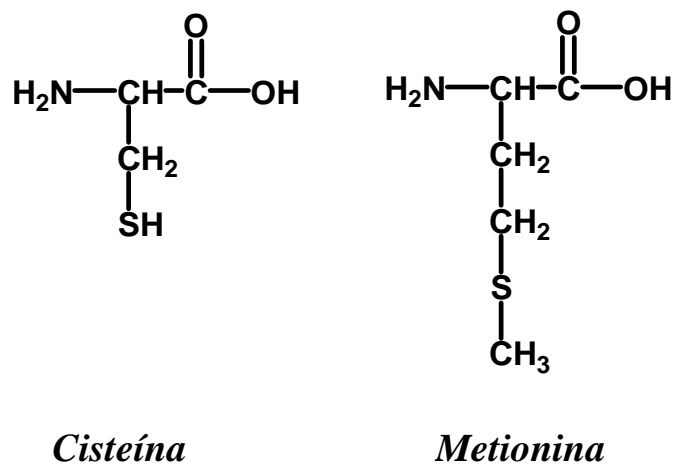


Figura 9.1 Estrutura química da cisteína e da metionina.

Por outro lado, as funções da metionina, **Figura 9.1**, não são muito conhecidas, mas existem algumas hipóteses de que funcionam como *protector de radicais livres*, desempenhando um papel muito importante *in vivo* durante as condições biológicas do *stress oxidativo*, bem como para a estabilidade da proteína [178, 184, 191].

Devido aos vários estados de oxidação do átomo de enxofre, a oxidação da cisteína e da metionina pode levar à formação de um grande número de compostos [178]. Neste contexto, ao longo deste capítulo é apresentado um estudo sistemático do comportamento electroquímico da cisteína e da metionina e os mecanismos de oxidação destes aminoácidos foram propostos [6].

9.2 CISTEÍNA

A oxidação electroquímica da cisteína foi estudada na superfície do GCE e do BDDE, utilizando voltametria cíclica e de DP, em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH e força iónica de 0,1 M e diferentes valores de pH.

9.2.1 Voltametria cíclica

O comportamento electroquímico da cisteína foi estudado por voltametria cíclica com a velocidade de varrimento de 25 mV s^{-1} , utilizando soluções de cisteína preparadas em electrólitos de suporte de tampão acetato pH = 4,2 e de tampão fosfato pH = 7,0, nas superfícies de CGE, **Figura 9.2**, e de BDDE **Figura 9.3**.

O voltamograma registado com o CGE numa solução de 175 μM de cisteína em 0,1 M tampão acetato pH = 4,2 mostrou duas reacções consecutivas de transferência de electrão, o pico P₂ a $E_{\text{pa}}^2 = + 0,92 \text{ V}$ e o pico P₃ a $E_{\text{pa}}^3 = + 1,43 \text{ V}$, **Figura 9.2**.

Quando comparado com os resultados obtidos em tampão acetato, o voltamograma cíclico efectuado numa solução de 175 μM de cisteína em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 apresentou um novo pico de oxidação, P₁ a $E_{\text{pa}}^1 = + 0,62 \text{ V}$, o pico P₂ ocorreu para o mesmo valor de potencial, $E_{\text{pa}}^2 = + 0,92 \text{ V}$, mas com uma corrente mais baixa, e o pico P₃ ocorreu a um potencial menos positivo, $E_{\text{pa}}^3 = + 1,33 \text{ V}$, **Figura 9.2**. Após vários voltamogramas sucessivos, nenhum novo pico de oxidação foi observado, logo os produtos formados em P₁, P₂ e P₃ não são electroactivos.

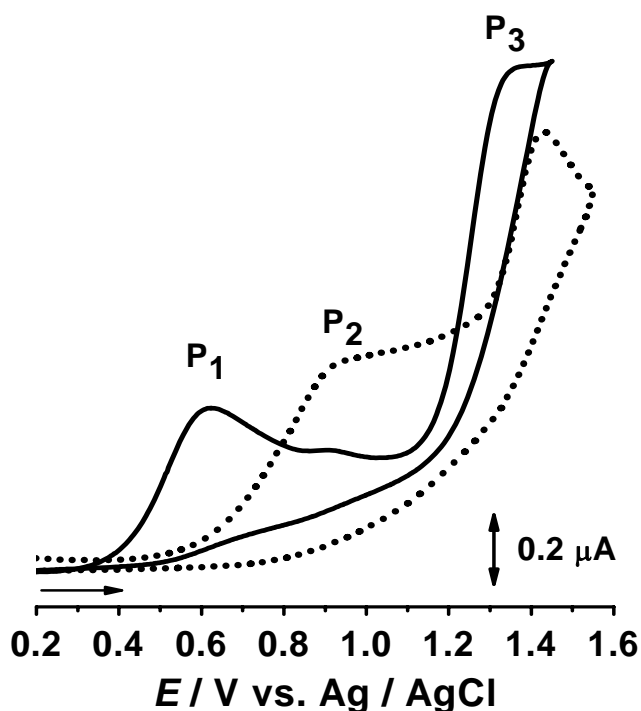


Figura 9.2 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos no GCE, em soluções de 175 μM de cisteína em 0,1 M (•••) tampão acetato pH = 4,0 e (—) tampão fosfato pH = 7,0, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Com aumento do número de voltamogramas registados na mesma solução, sem limpar a superfície do eléctrodo, foi observada a diminuição das correntes dos picos, devido à adsorção dos produtos de oxidação da cisteína superfície do eléctrodo.

Os voltamogramas cíclicos obtidos com o BDDE numa solução de 100 μM de cisteína mostraram um comportamento semelhante, **Figura 9.3**. Em 0,1 M tampão acetato pH = 4,2 foram observados dois picos de oxidação, e em 0,1 M tampão pH = 7,0, um novo pico de oxidação ocorreu a um potencial menos positivo.

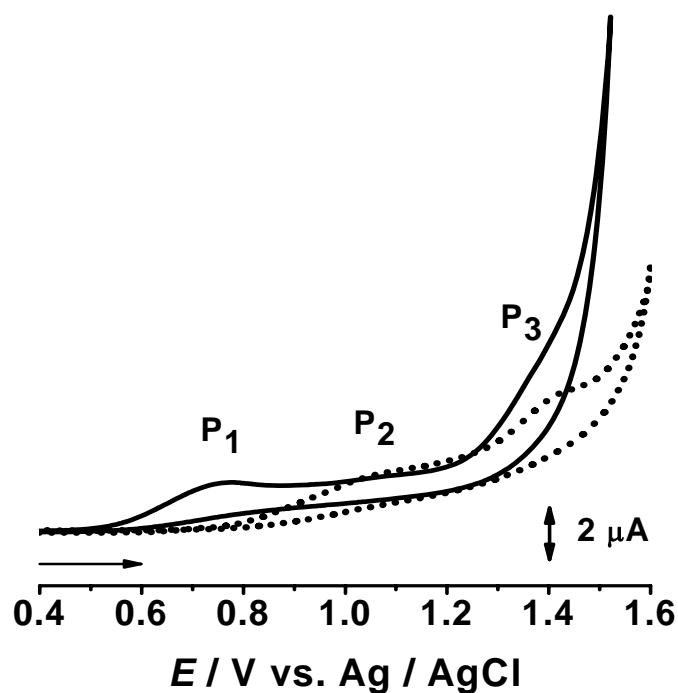


Figura 9.3 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos no BDDE, em soluções de 100 μM de cisteína em 0,1 M (•••) tampão acetato pH = 4,0 e (—) tampão fosfato pH = 7,0, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Para os dois valores de pH estudados e para os dois eléctrodos, GCE e BDDE, nos varrimentos catódicos dos voltamogramas cíclicos, nenhum pico foi observado, mostrando que o processo de oxidação da cisteína é irreversível.

9.2.2 Voltametria de impulso diferencial

O comportamento electroquímico da cisteína foi estudado por voltametria de DP em soluções de 150 μM de cisteína, no GCE, **Figura 9.4**, e de 75 μM de cisteína no BDDE, **Figura 9.5**, em electrólitos de suporte com $1 < \text{pH} < 8$. Devido à sensibilidade elevada da voltametria de DP quando comparada à voltametria cíclica, o primeiro pico de oxidação P_1 foi observado em todas as soluções com $\text{pH} > 2$.

Os voltamogramas registados com o GCE, **Figura 9.4A**, mostraram que, para electrólitos de suporte com $\text{pH} < 4,2$, o potencial do pico P_1 , $E_p^1 = + 0,69 \text{ V}$, é independente do pH. Para $\text{pH} > 4,2$, o potencial do pico P_1 é dependente do pH, estando deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, **Figura 9.4B**. A dependência é linear e segue a relação $E_p^2 (\text{V}) = 0,920 - 0,060 \text{ pH}$. A inclinação da recta de 60 mV por unidade de pH mostra que o pico de oxidação P_1 envolve a transferência do mesmo número de electrões e protões. A largura a meia altura do pico, $W_{1/2} \sim 115 \text{ mV}$, mostra que a reacção electroquímica envolve a transferência de um electrão [25].

Deste modo, é possível concluir que o primeiro pico de oxidação da cisteína, P_1 , ocorre para $\text{pH} > 4,2$, com a transferência de um electrão e um protão, enquanto que, para $\text{pH} < 4,2$ o potencial do pico P_1 é independente do pH, e envolve apenas a transferência de um electrão.

Para valores de $\text{pH} < 3,3$, o potencial do pico P_2 é dependente do pH, e segue a relação $E_p^2 (\text{V}) = 0,890 - 0,035 \text{ pH}$. O valor da largura a meia altura do pico, $W_{1/2} = 55 \text{ mV}$, indica que a reacção de oxidação correspondente ao P_2 envolve a transferência de dois electrões. Considerando a variação do potencial do pico de 35 mV por unidade de pH, o número de protões transferidos é de metade do número de electrões. Assim, o pico de oxidação P_2 envolve a transferência de dois electrões e um protão.

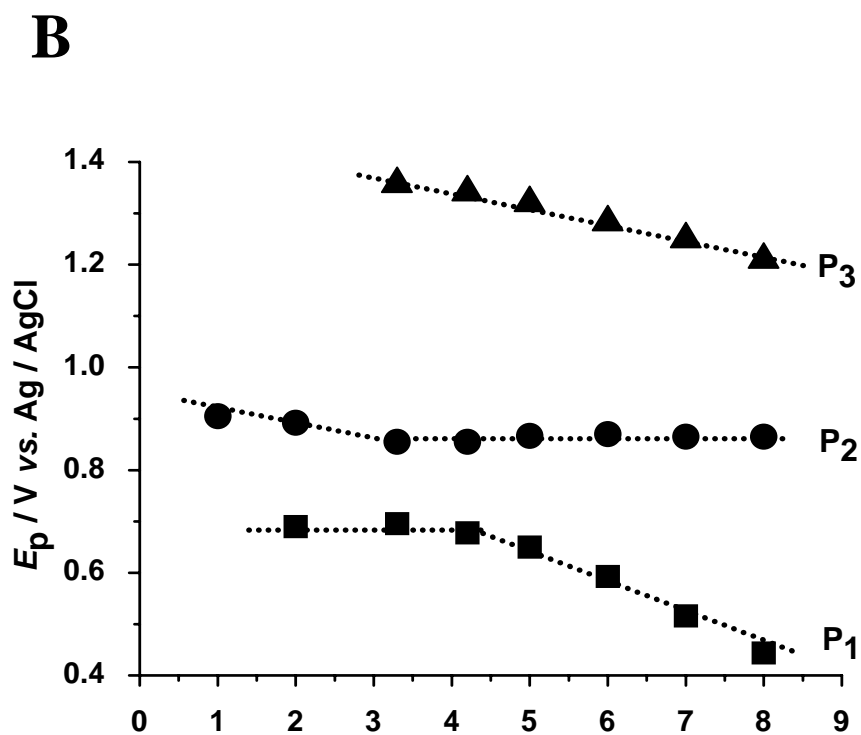
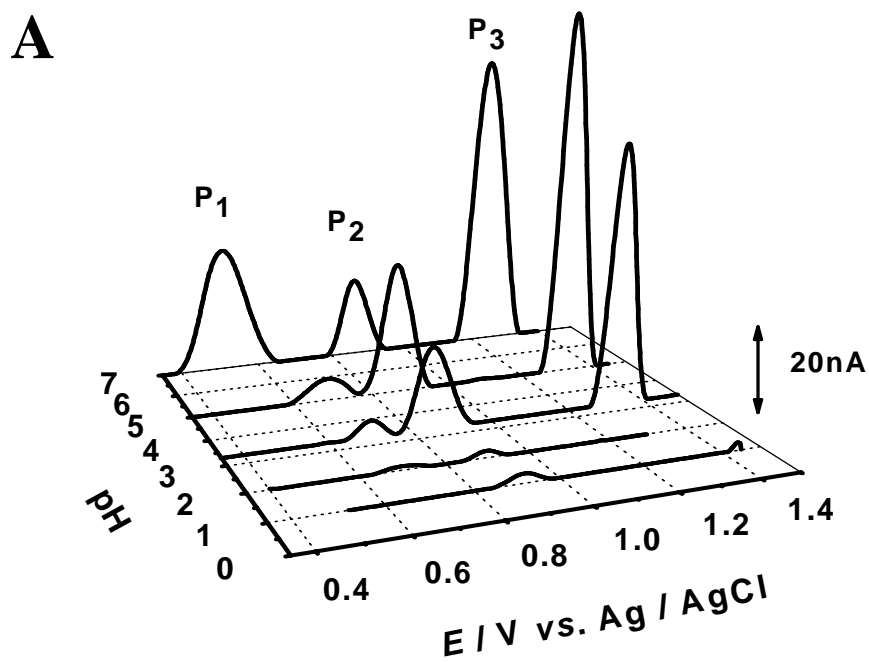


Figure 9.4 (A) Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos com o GCE em soluções de 150 μ M de cisteína em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH;

(B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^1 do pico P_1 ,

(●) E_p^2 do pico P_2 e (▲) E_p^3 do pico P_3 .

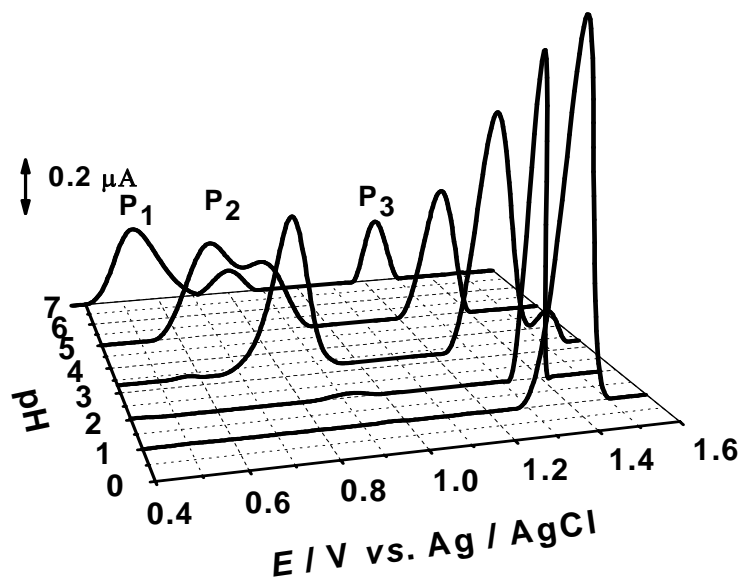
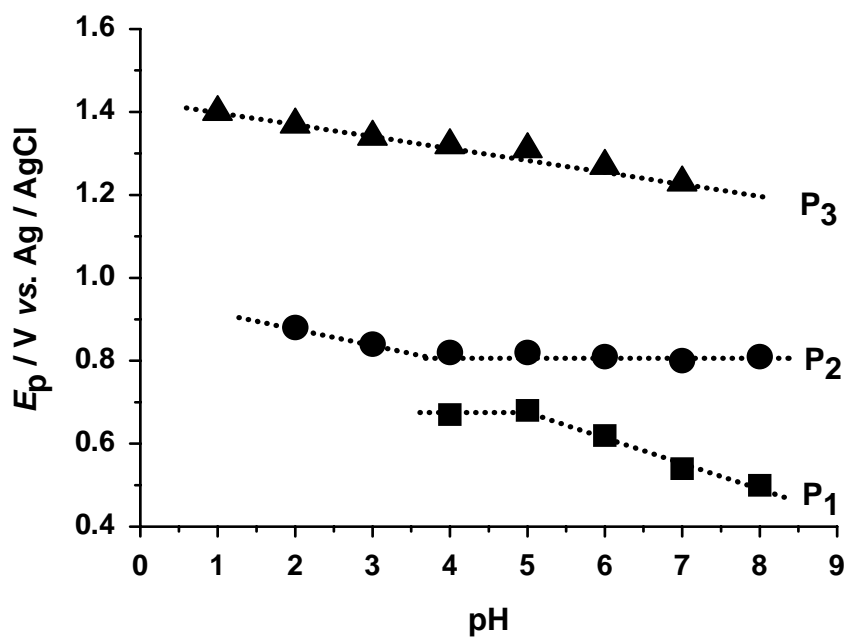
A**B**

Figure 9.5 (A) Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos com o BDDE em soluções de 100 μM de cisteína em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH;

(B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^1 do pico P₁,

(●) E_p^2 do pico P₂ e (▲) E_p^3 do pico P₃.

Para $\text{pH} > 3,3$, o potencial de oxidação do pico P_2 é independente do pH do electrólito de suporte. Nestas condições, a largura a meia altura do pico P_2 da oxidação da cisteína é $W_{1/2} \sim 100 \text{ mV}$, o que corresponde a uma reacção electroquímica que envolve a transferência de apenas um electrão e nenhum protão, **Figura 9.4B**.

Para soluções de electrólitos de suporte com $\text{pH} > 3,3$ ocorreu o pico de oxidação P_3 , **Figura 9.4A**, e o valor do potencial de oxidação deste pico diminui com o aumento do pH . A dependência é linear, e segue a relação $E_p^3 \text{ (V)} = 1,410 - 0,030 \text{ pH}$, **Figura 9.4B**. A inclinação da recta, de 30 mV por unidade de pH , mostra que o número de protões transferidos é de metade do número de electrões envolvidos na reacção. Como a largura a meia altura do pico de oxidação P_3 é $W_{1/2} \sim 65 \text{ mV}$, a reacção de oxidação envolve a transferência de dois electrões e um protão [238].

Os voltamogramas de DP registados com o BDDE em soluções de cisteína em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH foram semelhantes aos voltamogramas obtidos com o GCE, e os três picos de oxidação observados ocorreram aproximadamente nos mesmos valores de potencial, **Figura 9.5**. Uma vez que os compostos orgânicos apresentam uma adsorção muito reduzida na superfície do BDDE [242], esta semelhança mostra que a adsorção da cisteína ou dos seus produtos de oxidação na superfície dos eléctrodos não afecta o processo electroquímico de oxidação.

9.2.3 Mecanismo de oxidação

A cisteína sofre três reacções de oxidação consecutivas em ambos os GCE e BDDE.

Em meios muito ácidos, $\text{pH} < 3,3$, o grupo $-\text{SH}$ da cisteína é oxidado num mecanismo que envolve a transferência de um electrão, pico P_1 , com a formação dum catião radical. A estabilização deste radical através duma reacção homogénea, resulta na formação de uma espécie intermediária, que é oxidada para ácido cisteico, pico P_2 , num mecanismo que envolve a transferência de dois electrões e um protão.

Para $\text{pH} > 3,3$, a cisteína sofre uma oxidação electroquímica envolvendo a transferência dum electrão, pico P_1 , seguida pela desprotonação e produção de um radical. O ataque nucleofílico da água a este radical leva também a formação duma espécie intermediária, cuja oxidação leva à formação do ácido cisteico, o pico P_2 , num mecanismo que envolve a transferência de um electrão.

Por outro lado, os radicais formados no primeiro passo de oxidação, pico P_1 , podem dimerizar levando à formação da cistina, que, por sua vez, é oxidada com a transferência de dois electrões e um protão, pico P_3 , embora para potencial mais positivo devido à ligação forte covalente da ponte dissulfeto.

9.3 METIONINA

As reacções redox da metionina na superfície de GCE e de BDDE foram estudadas utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de DP, em electrólitos de suporte com força iónica de 0,1 M e diferentes valores de pH.

9.3.1 Voltametria cíclica

O voltamograma cíclico registado no GCE numa solução de 175 μM de metionina em 0,1 M tampão acetato pH = 4,2, **Figura 9.6**, apresentou duas reacções consecutivas de transferência de carga, o pico P_1 , a $E_{pa}^1 = + 1,10 \text{ V}$, e o pico P_2 a $E_{pa}^2 = + 1,35 \text{ V}$.

Por outro lado, o voltamograma cíclico registado no BDDE numa solução de 100 μM de metionina em 0,1 M tampão acetato pH = 4,2, mostrou a ocorrência de apenas o pico P_2 a $E_{pa}^2 = + 1,35 \text{ V}$, **Figura 9.7**. Em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0 foi observado apenas o pico P_2 para o mesmo valor de potencial, $E_{pa}^2 = + 1,35 \text{ V}$, tanto no CGE como no BDDE.

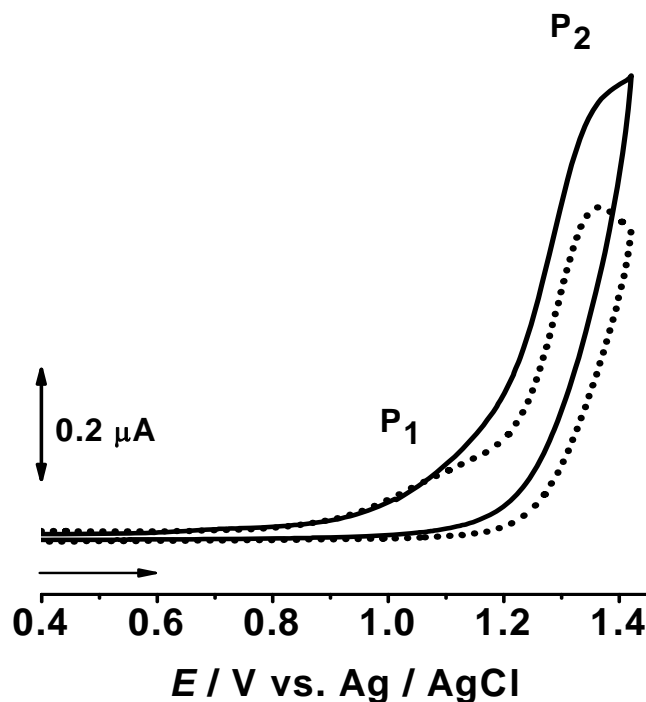


Figura 9.6 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos com o GCE em soluções de 175 μM de metionina em 0,1 M: (•••) tampão acetato pH = 4,0 e (—) tampão fosfato pH = 7,0; $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

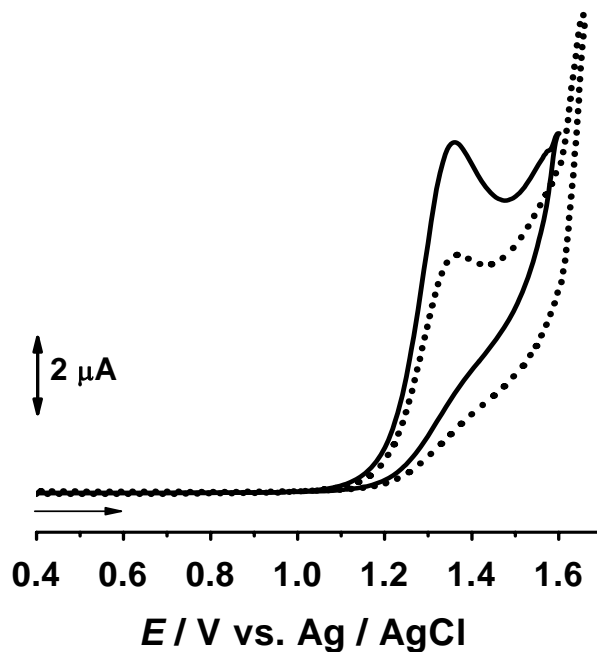


Figura 9.7 Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base, obtidos utilizando o BDDE em soluções de 100 μM de metionina em: (•••) 0,1 M tampão acetato pH = 4,0 e (—) 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Para todas as soluções de electrólito de suporte estudados, nos varrimentos catódicos nenhum pico foi observado, mostrando que, nestas condições, o processo de oxidação da metionina é irreversível.

9.3.2 Voltametria de impulso diferencial

O comportamento electroquímico da metionina foi estudado por voltametria de DP, em electrólitos de suporte com $1,0 < \text{pH} < 8,0$ e força iónica de 0,1 M e soluções de 150 μM de metionina no GCE, **Figura 9.8**, e de 75 μM no BDDE, **Figura 9.9**.

Na superfície do GCE, os voltamogramas de DP apresentaram resultados semelhantes aos de voltametria cíclica, o pico P_1 , que ocorreu só nos electrólitos de suporte com $\text{pH} < 3,3$, e o pico P_2 , a um valor de potencial mais positivo, que ocorreu para todos os electrólitos de suporte estudados, **Figura 9.8A**.

Para $\text{pH} < 3,3$, o potencial do pico P_1 é dependente do pH . A dependência é linear e segue a relação $E_p^1 \text{ (V)} = 1.440 - 0,033 \text{ pH}$, **Figura 9.8B**. A inclinação da recta, 33 mV por unidade de pH , mostra que o número de protões transferidos no primeiro passo do mecanismo de oxidação é metade do número de electrões. Considerando que a largura a meia altura do pico P_1 é $W_{1/2} \sim 53 \text{ mV}$, é possível concluir que a oxidação envolve a transferência de dois electrões e um protão.

O segundo pico P_2 é dependente do pH para valores inferiores a 3,3, e o potencial do pico desloca-se para valores menos positivos com o aumento do pH , segundo a relação: $E_p^2 \text{ (V)} = 1,330 - 0,030 \text{ pH}$, **Figura 9.8B**. A inclinação da recta de 30 mV por unidade de pH mostra que o número de protões transferidos durante ao processo de oxidação correspondente ao pico P_2 é metade do número de electrões envolvidos. O número de electrões foi determinado pela largura do pico a meia altura, $W_{1/2} \sim 65 \text{ mV}$, que corresponde a uma reacção electroquímica que envolve a transferência de dois electrões [238]. Portanto, o processo de oxidação correspondente ao pico P_2 , ocorre com a transferência de dois electrões e um protão. Para $\text{pH} > 3,3$ o potencial de oxidação do pico P_2 é independente do pH , **Figura 9.8B**. A largura a meia altura do pico aumentou, $W_{1/2} \sim 100 \text{ mV}$, e corresponde a uma reacção electroquímica envolvendo a transferência de um electrão.

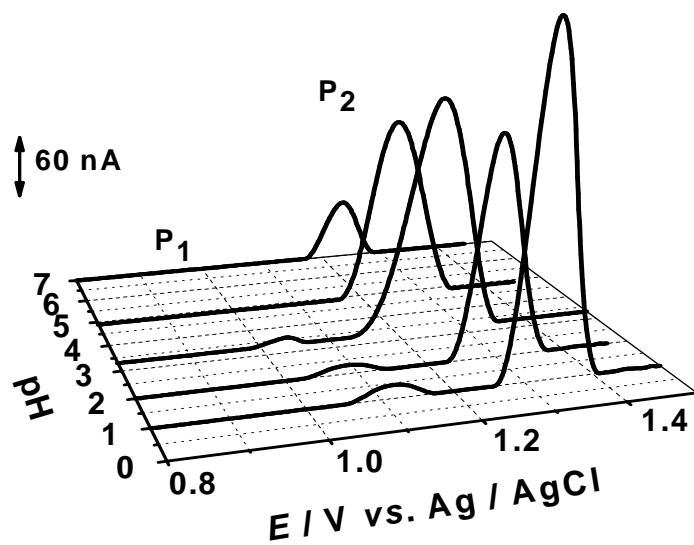
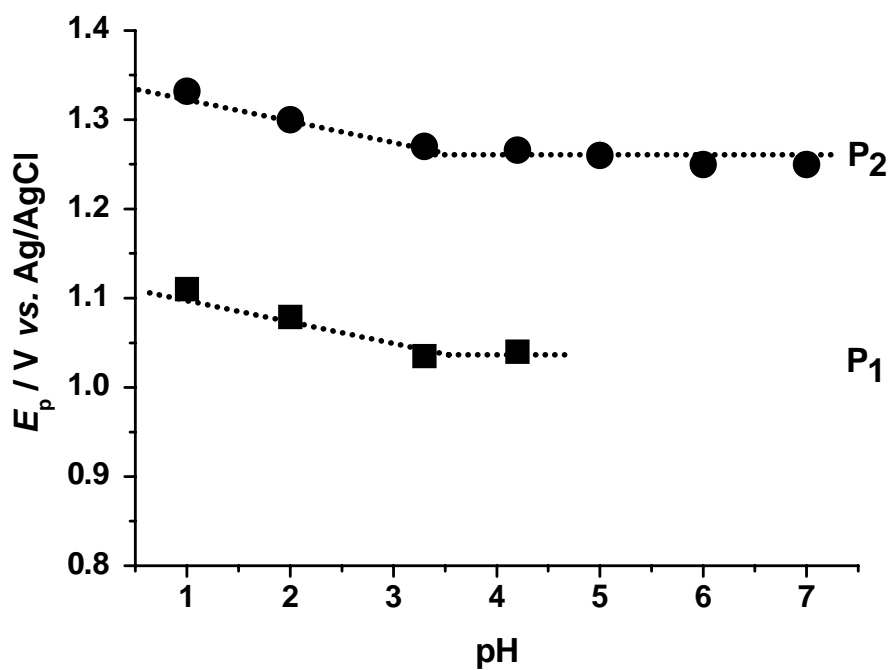
A**B**

Figure 9.8 (A) Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos com o GCE em soluções de 150 μ M de metionina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p^1 do pico P_1 e (●) E_p^2 do pico P_2 .

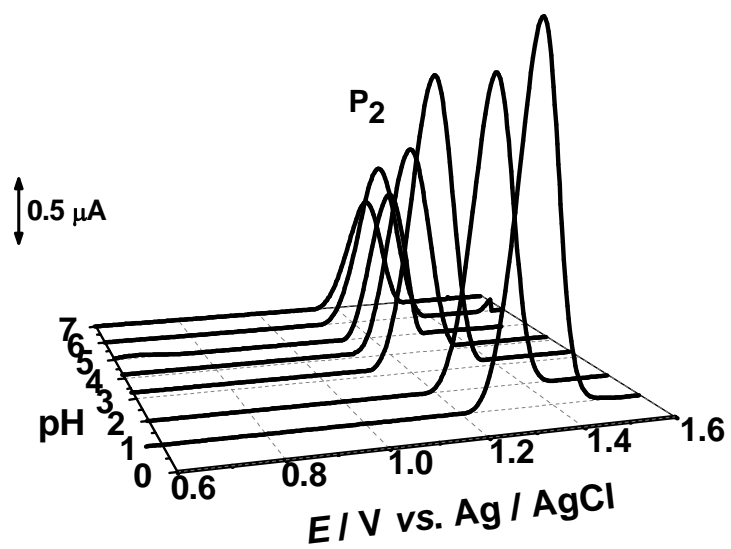
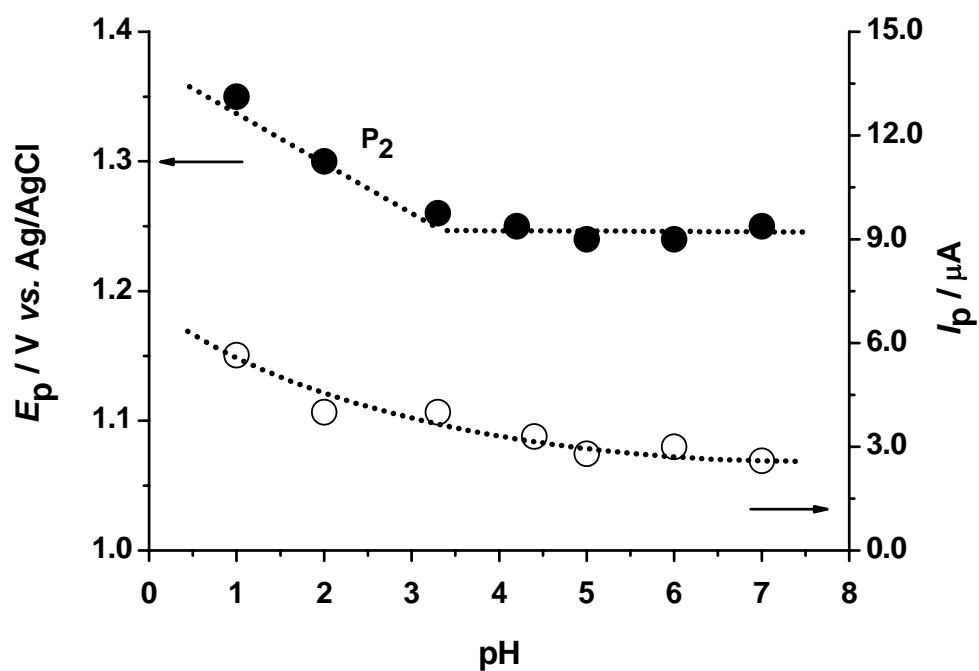
A**B**

Figure 9.9 (A) Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, obtidos com o BDDE em soluções de $75 \mu M$ de metionina em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH; (B) Gráfico da variação com o pH do (■) E_p e do (○) I_p do pico P_2 .

Quando comparado com os resultados obtidos na superfície de GCE, os voltamogramas de DP da metionina registados na superfície de BDDE mostraram a ocorrência de apenas o pico de oxidação P_2 , aproximadamente ao mesmo valor de potencial que no GCE, **Figura 9.9**. No entanto, o valor da corrente do pico P_2 apresentou valores muito mais elevados do que observado na superfície de GCE.

Devido a uma adsorção muito reduzida da metionina na superfície do BDDE, provavelmente a oxidação das moléculas de metionina na proximidade da superfície do BDDE é dificultada, ocorrendo para potenciais mais elevados. Por esta razão o pico de oxidação P_2 observado nos voltamogramas apresentados na **Figura 9.9** poderá representar uma convolução dos dois picos de oxidação P_1 e P_2 da Met.

9.3.3 Mecanismo de oxidação

Na superfície do GCE, em electrólitos de suporte com $\text{pH} < 3,3$, foram observadas duas reacções consecutivas de transferência de electrão. Os dois passos de oxidação ocorrem com a transferência de dois electrões e um protão. Em electrólitos de suporte com $\text{pH} > 3,3$ é transferido apenas um electrão. No entanto, no intervalo $3,3 < \text{pH} < 4,2$ a oxidação ocorre em dois passos, enquanto que para $\text{pHs} > 4,2$ foi observado apenas o segundo passo de oxidação.

Por sua vez, com o BDDE e para todos os electrólitos de suporte estudados, foi observado apenas o segundo passo de oxidação da metionina, provavelmente devido à adsorção muito reduzida da metionina na superfície do eléctrodo e à ocultação do primeiro passo de oxidação.

Tendo em consideração os resultados voltamétricos obtidos e a sua correlação com os mecanismos de oxidação *in vivo* da metionina, é possível concluir que a oxidação leva à formação de sulfóxido de metionina no primeiro passo de oxidação e de metionina sulfona no segundo passo, através de várias espécies intermediárias.

9.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo foram investigados os mecanismos de oxidação electroquímica dos aminoácidos que contem enxofre, cisteína e metionina, através de métodos electroquímicos de voltametria cíclica e de DP, usando dois eléctrodos, GCE e BDDE, numa ampla gama de pH.

A oxidação destes aminoácidos é um processo irreversível, controlado pela difusão, dependente do pH e ocorre num mecanismo complexo que envolve a transferência de electrões e protões. O aminoácido cisteína sofre três reacções de oxidação consecutivas em GCE e BDDE. A primeira etapa envolve a oxidação do grupo sulfidrilo e a formação dum radical. O ataque nucleofílico da água leva à formação de espécies intermediárias que podem ser oxidadas, e do ácido cisteico da cisteína. Além disso, a oxidação do grupo sulfidrilo pode formar uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de cisteína, formando a cistina, que é oxidada a um potencial mais positivo, devido à forte ligação covalente da ponte dissulfeto.

A oxidação da metionina ocorre em dois passos, levando à formação de sulfoxido de metionina e metionina sulfona, através de várias espécies intermédias. No entanto, a adsorção da metionina no BDDE é reduzida, e o seu processo de oxidação ocorre num único passo, levando à formação de metionina sulfona.

Capítulo 10

Oxidação electroquímica da metionina sulfóxido reductase A

10.1 INTRODUÇÃO

A enzima metionina sulfóxido reductase A (MsrA) endógena, sintetizada pela bactéria *Escherichia coli*, é uma pequena proteína de 23 kDa, com a estrutura primária constituída por 211 aminoácidos. A sua estrutura secundária apresenta 5 α -hélices, constituídas por 50 resíduos (23%) e 10 folhas β , constituídas por 36 resíduos (16%),

Figura 10.1.

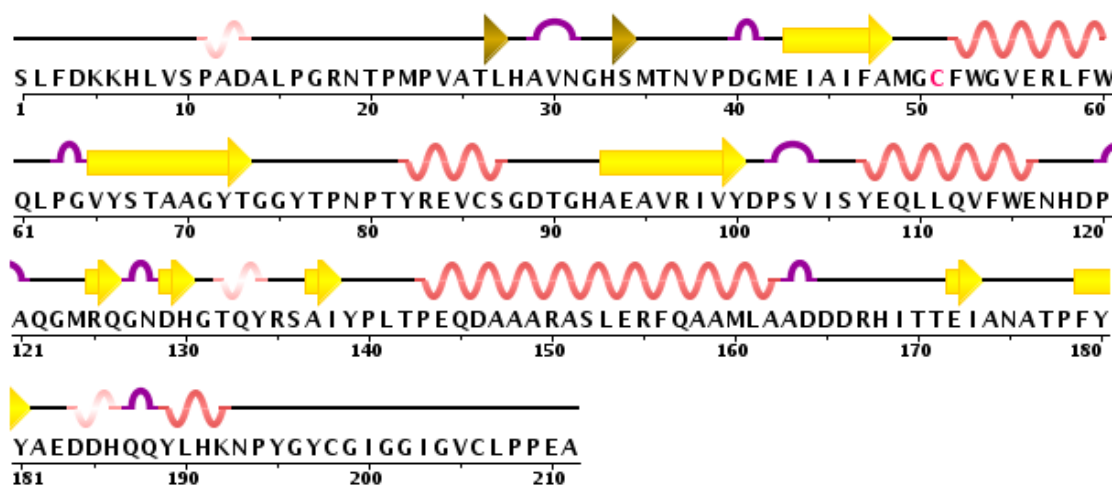


Figura 10.1. Estruturas primária e secundária da Metionina sulfóxido reductase A

[PDB, ficheiro 2GT3, UniProtKB P0A744] [170].

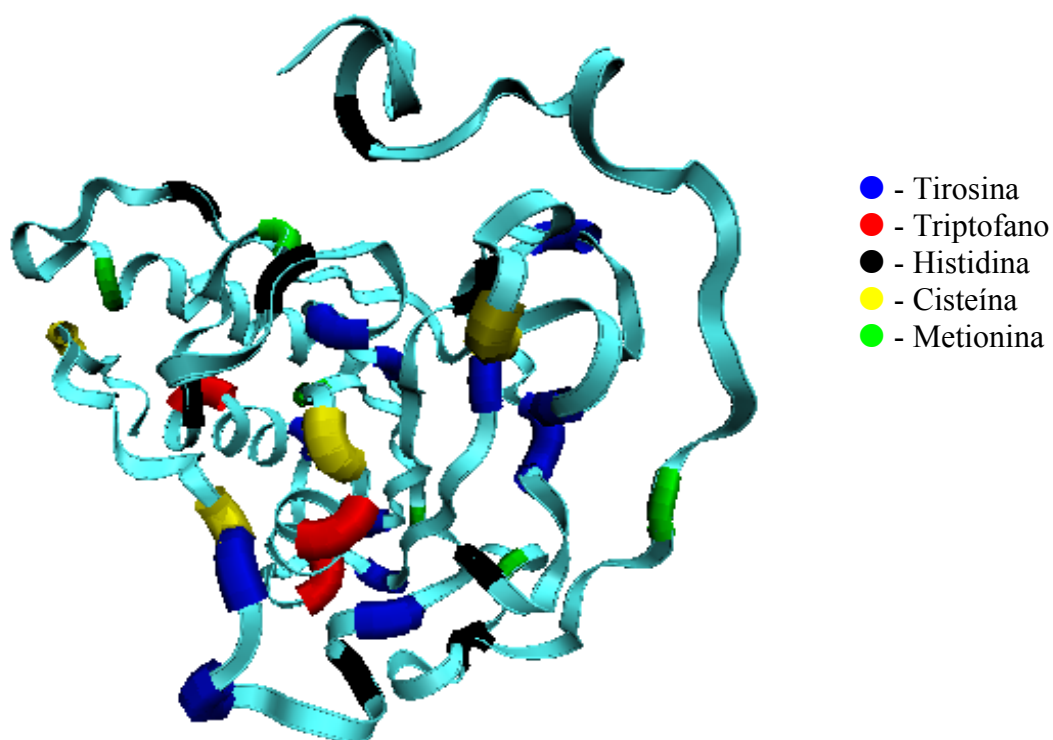


Figura 10.2 Estrutura terciária da metionina sulfóxido reductase A [modificada a partir do PDB, ficheiro 2GT3, UniProtKB P0A744] [170].

Uma análise da estrutura primária da MsrA mostra que, dos 212 resíduos de aminoácidos, 35 apresentam propriedades electroquímicas: 13 resíduos de tirosina (Y), 3 resíduos de triptofano (W), 9 resíduos de histidina (H), 4 resíduos de cisteína (C) e 6 resíduos de metionina (M). Os aminoácidos electroactivos são distribuídos de maneira aleatória ao longo da sua estrutura terciária, **Figura 10.2**.

O objectivo do estudo apresentado neste capítulo foi a investigação das reacções de transferência de electrão do MsrA. Um filme de MsrA foi depositado nas superfícies de GCE e de BDDE, e o seu comportamento electroquímico foi investigado por voltametria cíclica e de DP.

10.2 OXIDAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO GCE

O filme fino de MsrA foi obtido cobrindo a superfície de GCE com 5 μL de solução 0,33 mg mL^{-1} de MsrA. Após a secagem da primeira camada de filme, o mesmo procedimento foi repetido mais uma vez.

10.2.1 Voltametria cíclica

O comportamento electroquímico da MsrA adsorvida na superfície de GCE foi estudado por voltametria cíclica em soluções 0,1 M tampão acetato pH = 4,2 e tampão fosfato pH = 7,0, **Figura 10.3**.

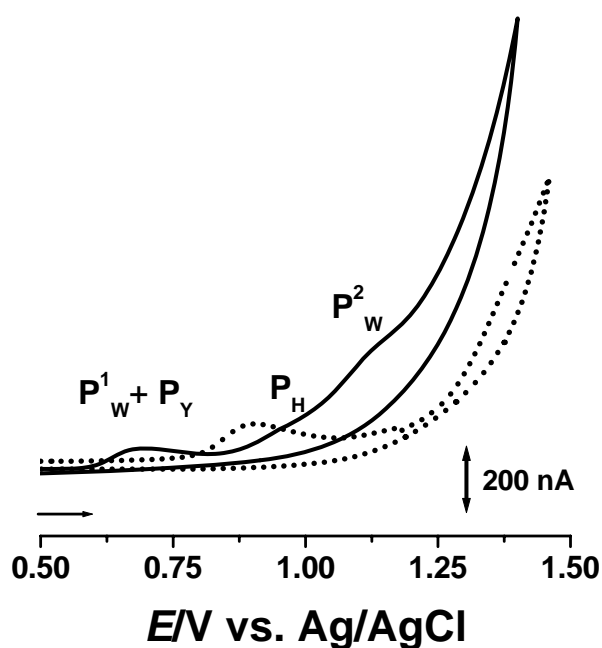


Figura 10.3. Voltamogramas cíclicos com subtração da linha de base da MsrA adsorvida no GCE, obtidos em (•••) 0,1 M tampão acetato pH = 4,0 e (—) 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas registados em ambos os pHs apresentaram três picos de oxidação. Em tampão acetato pH = 4,2, o primeiro pico de oxidação ocorreu a $E_p = + 0,90 \text{ V}$ e é identificado com a oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano, picos P_Y e P^1_W . O segundo pico de oxidação P_H observado a $E_p = + 1,15 \text{ V}$ é devido à oxidação dos resíduos de histidina, enquanto que a reacção que ocorreu a $E_p = + 1,35 \text{ V}$ corresponde ao o segundo pico de oxidação dos resíduos de triptofano, P^2_W .

Aumentando o valor do pH do electrólito de suporte para pH = 7,0 os três picos de oxidação ocorreram para potenciais menos positivos, **Figura 10.3**. Por outro lado, foi observado que as correntes dos picos de oxidação dos resíduos de tirosina, triptofano e histidina da MsrA, diminuem com o aumento do valor de pH do electrólito de suporte. No entanto, estes aminoácidos livres em solução apresentaram corrente de pico mais elevadas em soluções de eletrólito de suporte com pH neutro, como descrito no *Capítulo 8*. A diminuição do pico de oxidação dos resíduos de tirosina, triptofano e histidina da MsrA deve-se à mudança de conformação da proteína adsorvida na superfície do eléctrodo.

10.2.2 Voltametria de impulso diferencial

A oxidação electroquímica da MsrA adsorvida na superfície do GCE foi estudada por voltametria de DP, numa ampla gama de pH entre 1,0 e 12,0, **Figura 10.4**. Para pH < 3, os voltamogramas registados entre 0,00 V e + 1,40 V apresentaram apenas o primeiro pico, relacionado com à oxidação dos resíduos de tirosina (P_Y) e de triptofano (P^1_W), também bservado para todos os electrólitos de suporte estudados, **Figuras 10.4**.

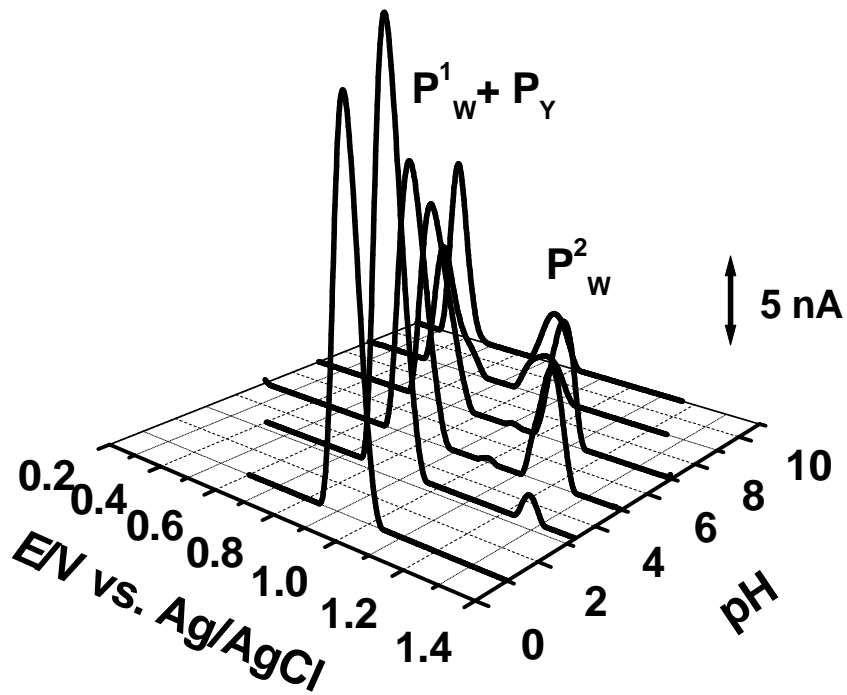


Figura 10.4 Voltamogramas de DP com correcção da linha de base, da MsrA adsorvida no GCE, obtidos em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

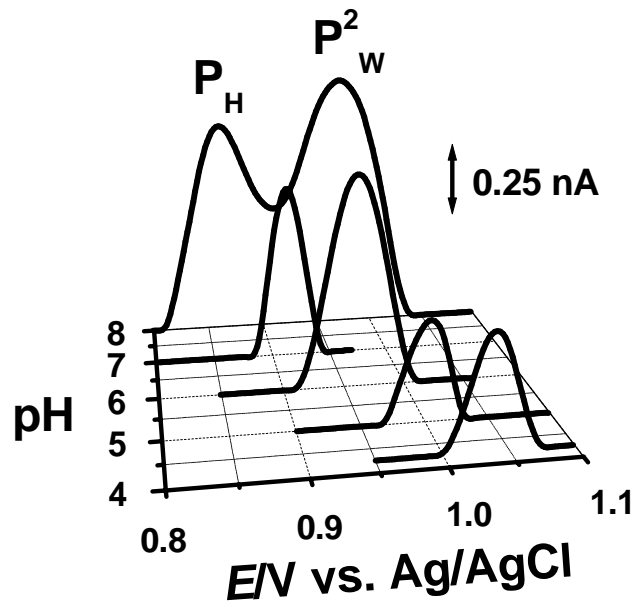


Figura 10.5 Voltamogramas de DP da **Figura 10.4**, no intervalo de potencial + 0,80 V a + 1,10V, da MsrA adsorvida no GCE, obtidos em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH.

Aumentando o pH da solução de electrólito de suporte apareceram outros dois picos de oxidação, P^2_w e P_H , como previamente observado nas experiências de voltametria cíclica. O segundo pico de oxidação, P^2_w , **Figuras 10.5 e 10.6**, ocorre somente em electrólitos com $4 < \text{pH} < 8$, enquanto que o terceiro pico de oxidação, P_H , foi observado para todos os electrólitos de suporte com $\text{pH} > 3$, **Figuras 10.4 e 10.6**.

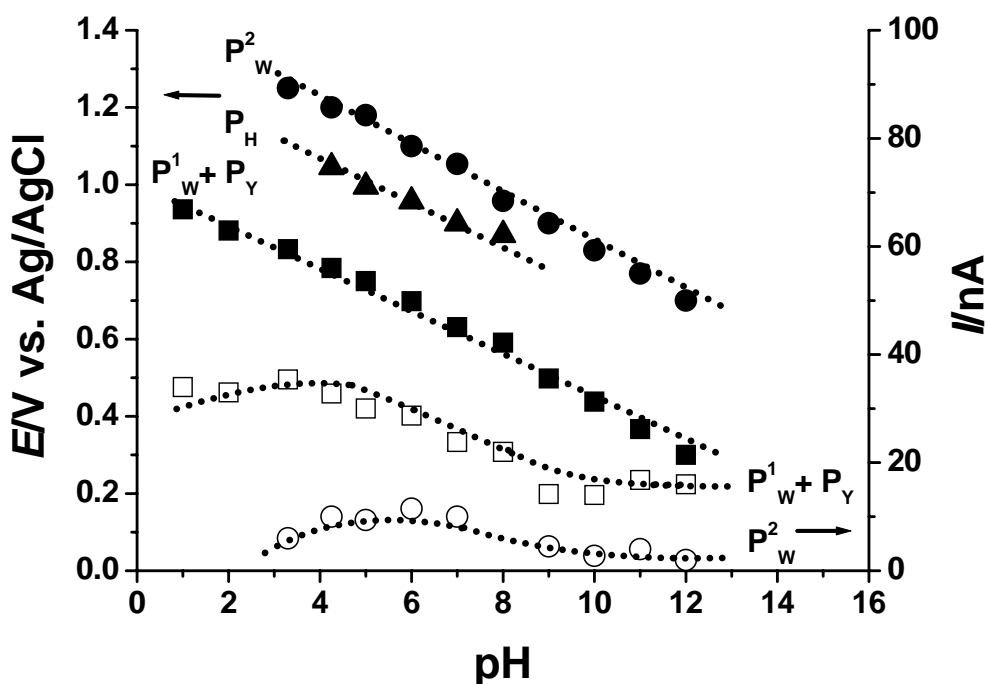


Figura 10.6 Gráfico da variação com o pH de: (■) E_p e (□) I_p dos picos P^1_w e P_Y , (●) E_p e (○) I_p do pico P^2_w e (▲) E_p do pico P_C .

Os potenciais de todos os picos são dependentes do pH, deslocando-se para valores menos positivos com o aumento do pH, **Figura 10.6**. A inclinação das rectas de 60 mV e a largura a meia altura encontrada para os três picos de ~ 100 mV mostra que as reacções de oxidação ocorrem com a transferência de um electrão e um protão, de acordo com os resultados obtidos no *Capítulo 7*, para os aminoácidos electroactivos constituintes de MsrA.

10.3 OXIDAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO BDDE

Os processos redox do triptofano e da tirosina, que entram na composição da MsrA, foram investigados de forma exaustiva no *Capítulo 8*, sendo verificado que, na superfície do GCE, o primeiro pico de oxidação do triptofano ocorre para o mesmo potencial que o pico de oxidação da tirosina. No entanto, usando o BDDE e a derivada de primeira ordem [255], dos voltamogramas de DP, os processos oxidativos dos dois aminoácidos podem ser separados, uma vez que a oxidação do triptofano no BDDE ocorre a potenciais mais positivos do que a oxidação da tirosina.

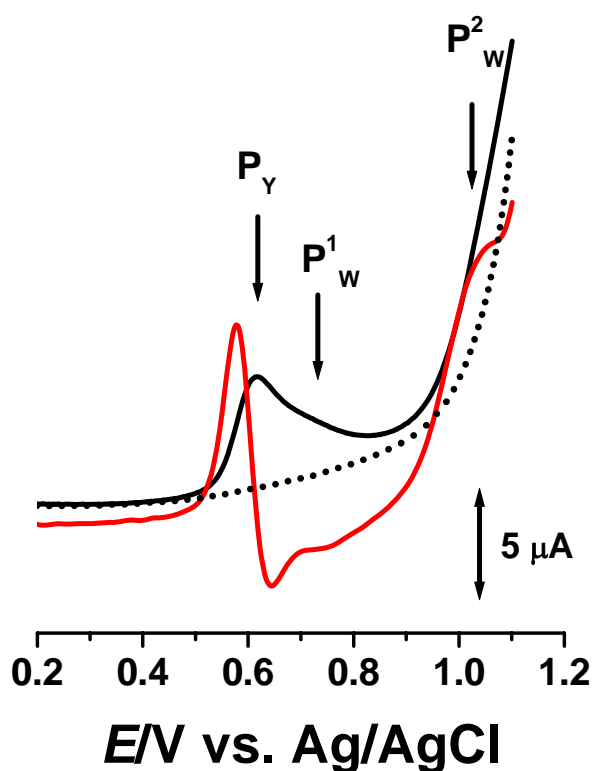


Figura 10.7 Voltamogramas de DP da MsrA imobilizada a BDDE, obtidos em (---) 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (—) primeiro varrimento de DP e (—) respectiva derivada.

O filme fino de MsrA no BDDE foi preparado de maneira semelhante ao GCE, cobrindo a superfície do eléctrodo com 5 μL de solução de 0,33 mg mL^{-1} de MsrA e repetindo o processo uma vez após a secagem do filme.

Em 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0, o filme fino de MsrA adsorvido na superfície do BDDE, **Figura 10.7**, apresenta dois picos de oxidação na região de potencial + 0,50 V a + 0,80 V, **Figura 10.7**, diferente dos resultados obtidos nas mesmas condições com na superfície de GCE, **Figura 10.8**.

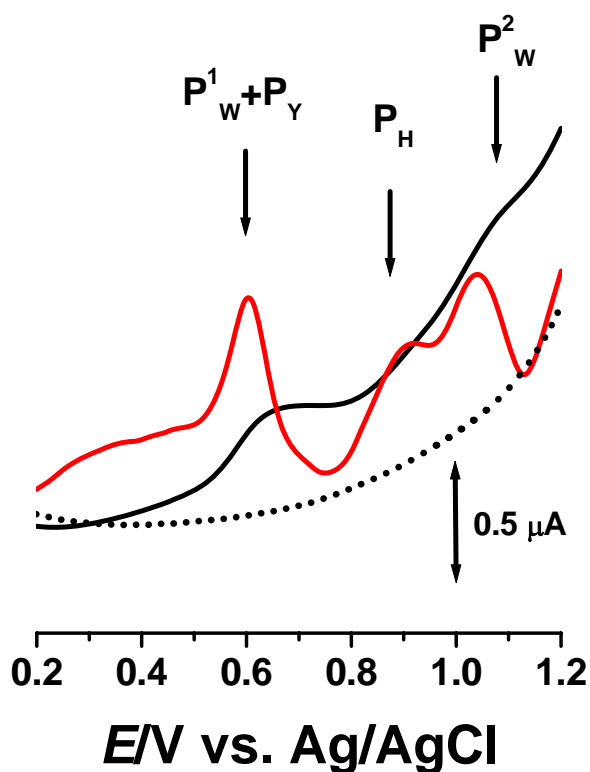


Figura 10.8 Voltamogramas de DP da MsrA imobilizada a GCE, obtidos em (---) 0,1 M tampão fosfato pH = 7,0: (—) primeiro varrimento e (—) respectiva derivada.

A derivada de primeira ordem do voltamograma de DP registado para a MsrA adsorvida no BDDE, apresenta dois máximos bem separados, correspondentes à oxidação dos resíduos de tirosina e de triptofano, **Figura 10.7**. A oxidação dos resíduos de tirosina, pico P_Y , ocorre a $E_p = + 0,60$ V, enquanto que o primeiro pico de oxidação dos resíduos de triptofano, o pico P^1_w , aparece a um potencial mais positivo, $E_p = + 0,70$ V. O segundo pico de oxidação dos resíduos de triptofano, P^2_w , ocorreu a $E_p = + 1,08$ V.

Em comparação, a derivada de primeira ordem do voltamograma de DP registado para a MsrA imobilizada no GCE mostra que a oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano ocorre ao mesmo potencial, **Figura 10.8**.

10.4 A ADSORÇÃO E A OXIDAÇÃO DA MsrA

Os eléctrodos de carbono têm uma elevada actividade de superfície, o que explica a sua susceptibilidade para a contaminação por adsorção de compostos orgânicos. Na superfície de carbono podem ser formadas ligações com hidrogénio, grupos hidróxilo e carboxilo e até quinonas.

A adsorção das proteínas na superfície dos eléctrodos de carbono está directamente influenciada pela composição e carácter dos grupos H e/ou O existentes na superfície de carbono. As proteínas apresentam maior adsorção nas superfícies hidrofóbicas, quando comparado com a adsorção nas superfícies hidrofílicas [217-219].

As terminações de hidrogénio na superfície do eléctrodo são hidrofóbicas, com alta afinidade electrónica negativa, enquanto que as terminações de oxigénio são hidrofílicas com afinidade electrónica positiva.

Contudo, o processo de adsorção é dinâmico e pode ser dividido em cinco etapas: (1) adsorção, (2) rearranjo estrutural dependente do tempo e (3) desorção [219].

A hidrofobicidade é um factor importante para a identificação das características das proteínas e a escala Kyte-Doolittle é utilizada de maneira exaustiva para a detecção das regiões hidrofóbicas das proteínas. O aminoácido com o menor valor na escala Kyte-Doolittle num determinado sítio da proteína é considerado o aminoácido mais hidrofílico, enquanto que o aminoácido com o valor mais elevado é considerado o menos hidrofílico [153].

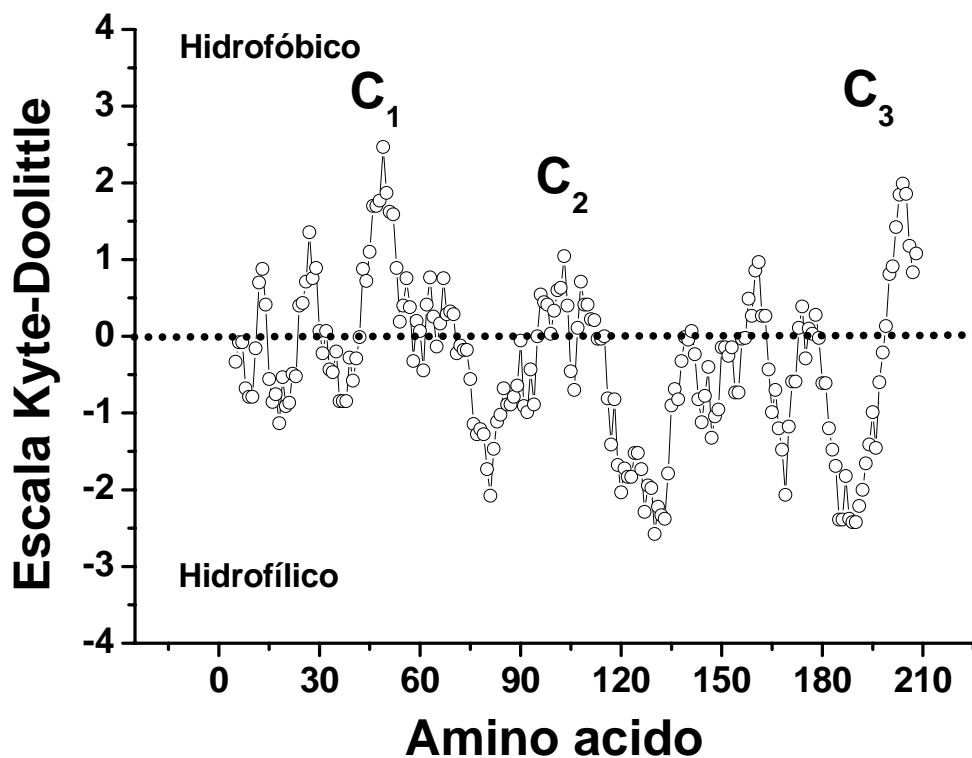


Figure 10.9 Gráfico do índice hidropático da sequência primária de aminoácidos da MsrA.

A MsrA, cuja estrutura primária está apresentada na **Figura 10.1**, revelou no gráfico do índice hidropático, **Figura 10.9**, três principais domínios hidrofóbicos, C1, C2 e C3, **Figura 10.10**:

C1: AIFAMGCF**W**GVERLF**W**QLPGV**Y**STAAG**Y**
 45 72

C2: AVRIV**Y**DPSVIS**Y**EQLLQVF**W**
 95 115

C3: **Y**G**Y**CGIGGIGVCLPPE
 195 210

SLFDKK**H**LVSPADALPGRNTPMPVATL**H**AVNG**H**SMTNVPDGMEIAIFAMGCF
 1 10 20 30 40 50

WGVERLF**W**QLPGV**Y**STAAG**Y**TGG**Y**TPNPT**Y**REVCSGDT**H**AEA**Y**VRIV**Y**DP
 53 60 70 80 90 100

SVIS**Y**EQLLQVF**W**EN**H**DPAQGMRQGN**D**HGT**Q**YRS**A**I**Y**PLTPEQDAAARASLE
 103 110 120 130 140 150

RFQAAMLAADDDR**H**ITTEIANATPF**Y**YASDD**H**Q**Q**Y**L**HKN**P****Y**G**Y**CGIGGIGV
 155 160 170 180 190 200

CLPPE
 206 210

Figura 10.10 Estrutura primária da Metionina sulfóxido reductase A, com os três principais domínios hidrofóbicos, C1, C2 e C3.

As cadeias de aminoácidos C1, C2 e C3 contêm os resíduos electroactivos de tirosina (Y) e triptofano (W) da MsrA, sendo os resíduos de triptofano localizados exclusivamente nestas regiões. Deste modo, a adsorção da MsrA na superfície do GCE é facilitada através da interacção hidrofóbica estabelecida pelas regiões C1-C3 com a superfície hidrofóbica do eléctrodo, possibilitando a oxidação destes aminoácidos. Além destas regiões, os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos estão misturados, sem nenhuma forte evidência de hidrofobicidade.

10.5 CONCLUSÕES

A proteína MsrA sofre oxidação electroquímica nas superfícies de GCE e de BDDE, devido à oxidação dos seus resíduos de aminoácidos tirosina, triptofano e histidina. As três regiões hidrofóbicas da MsrA, reveladas através do seu índice hidropático, apresentam na sua estrutura os resíduos oxidáveis de tirosina, triptofano e histidina, o que permite a adsorção hidrofóbica da MsrA com os resíduos oxidáveis junto a superfície do eléctrodo e conseqüentemente facilita a transferência electrónica.

O processo de oxidação da MsrA immobilizada na superfície dos GCE e BDDE, ocorre em três etapas consecutivas, dependentes de pH. A primeira etapa corresponde à oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano, a segunda etapa corresponde à oxidação da histidina, e a terceira corresponde ao segundo passo na de oxidação do triptofano a um potencial mais positivo. A utilização do BDDE apresentou uma vantagem essencial uma vez que permitiu a separação dos picos de oxidação do triptofano e tirosina.

Os métodos voltamétricos utilizados no estudo electroquímico da MsrA na superfície dos GCE e BDDE, revelaram-se ferramentas essenciais para obter informações relevantes não apenas sobre o mecanismo de oxidação, mas também sobre a sua adsorção na superfície destes eléctrodos, abrindo caminho para a análise de novas proteínas, através da investigação electroquímica dos seus resíduos com propriedades electroquímicas.

Capítulo 11

Conclusões

O objectivo deste trabalho foi a investigação do comportamento electroquímico e dos mecanismos de oxidação de vários compostos aromáticos, de aminoácidos e de proteínas. Para este efeito, foram realizadas experiências voltamétricas na superfície do GCE e do BDDE, usando voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada.

Os eléctrodos utilizados são constituídos por diferentes formas alotrópicas de carbono: amorfo para GCE e cristalino para BDDE, apresentando diferentes propriedades físicas e químicas. Por esta razão, em primeiro lugar foi caracterizado o BDDE. A geração electroquímica *in situ* de radicais hidróxilo na superfície de BDDE foi investigada em diferentes soluções de electrólito de suporte e foi investigada a geração electroquímica dos radicais hidróxilo, que podem interagir e oxidar compostos orgânicos.

O estudo sistemático dos processos de eléctrodo envolvidos na oxidação de moléculas orgânicas de vários compostos aromáticos com estrutura química simples, nomeadamente fenol, indol e alguns dos seus derivados, permitiu esclarecer os mecanismos de oxidação de moléculas com importância biológica mais complexas como os alcalóides berberina e sanguinarina, os aminoácidos e a proteína MsrA.

Os mecanismos de oxidação do fenol e dos seus derivados *para*-substituídos, 4-etilfenol e tiramina, foram propostos. A oxidação do fenol é irreversível, com a formação de dois produtos de oxidação, *orto*-quinona e *para*-quinona. Estes produtos de

oxidação são, por sua vez, oxidados reversivelmente através de um mecanismo dependente do pH. Os derivados de fenol 4-etilfenol e tiramina apresentam um comportamento semelhante ao do fenol. A oxidação destes compostos ocorre com a transferência de um electrão e um protão e leva à formação de um único produto de oxidação, devido a estar ocupada a posição *para* pelos diferentes substituintes, ao contrário dos dois produtos de oxidação do fenol.

O comportamento electroquímico do ASA e do TRF foi investigado antes e depois da sua hidrólise em água e em meio alcalino. O estudo da oxidação do ASA e do TRF com o GCE e com o BDDE ajudou a esclarecer os processos electroquímicos que ocorrem na superfície destes eléctrodos. Enquanto que, com o GCE, só foi possível a determinação do ASA e do TRF através dos seus produtos de hidrólise, o SA e o HTB, com o BDDE, devido às características da sua superfície, foi possível a determinação do ASA e do TRF.

O estudo electroquímico comparativo do indol e dos seus derivados C3-substituídos, indol-3-acetamida, triptamina, gramina, ácido indol acético, ácido indol propiónico e ácido indol butírico, permitiu esclarecer os mecanismos de oxidação desses compostos. A oxidação electroquímica do indol é irreversível e depende do pH. O mecanismo de oxidação dos derivados de indol C3-substituídos estudados é mais complexo e ocorre em dois passos irreversíveis, dependentes do pH. O primeiro passo corresponde à oxidação do carbono C2 do anel pirrol e o segundo passo corresponde à hidroxilação electroquímica do carbono C7 do grupo benzeno, que resulta na formação de um grupo fenol electroactivo. A oxidação deste grupo leva à formação de dois produtos electroactivos com substituintes nas posições *para* e *orto*, que adsorvem na superfície do eléctrodo e são oxidados de maneira reversível.

A sanguinarina e a berberina podem participar em diversas reacções redox no meio intracelular e as propriedades de transferência de electrões destes alcalóides foram investigadas. Os resultados mostraram que a oxidação destes compostos é um processo quase reversível, controlado pela difusão, ocorrendo num mecanismo complexo com transferência de electrões e de protões. Em todos os electrólitos estudados, os produtos de oxidação da berberina e da sanguinarina mostraram processos redox reversíveis.

Os mecanismos de oxidação dos aminoácidos tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina foram investigados usando o GCE e o BDDE.

Relativamente aos estudos efectuados com aminoácidos tirosina e triptofano, a caracterização voltamétrica das moléculas de fenol, indol e dos seus derivados foi essencial e ajudou esclarecer os processos de transferência de electrão destes aminoácidos. A oxidação da tirosina está relacionada com a oxidação do grupo fenol, envolvendo a formação de um radical fenóxido estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, que leva à formação dum produto de oxidação electroactivo. O triptofano tem duas etapas irreversíveis de oxidação, dependentes de pH. A primeira etapa da oxidação corresponde à oxidação do carbono C2 do anelo pirrol, seguida pela hidroxilação na posição C7 do grupo benzeno do indol e à formação de produtos de oxidação que adsorvem na superfície do eléctrodo e sofrem também uma oxidação reversível. Na superfície de GCE a primeira etapa de oxidação do triptofano ocorre a um potencial igual à oxidação da tirosina. No entanto, utilizando a superfície de BDDE é possível diferenciar entre os potenciais dos picos de oxidação da tirosina e do triptofano.

O comportamento anódico da histidina foi estudado, e para os dois eléctrodos utilizados, a oxidação electroquímica envolve o mesmo mecanismo ocorrendo apenas

no intervalo $3,0 < \text{pH} < 9,0$, com a transferência de um electrão e um protão do grupo imidazole e a formação dum radical. A hidroxilação pelo ataque nucleofílico da água estabiliza este radical, levando à formação de 2-oxohistidina.

A oxidação dos aminoácidos que contêm enxofre, cisteína e metionina, é um processo irreversível, controlado pela difusão, dependente do pH, e ocorre num mecanismo complexo com a transferência de electrões e protões.

A proteína MsrA sofre oxidação electroquímica nos GCE e BDDE, devido aos seus resíduos oxidáveis de tirosina, triptofano e histidina. O mecanismo de oxidação da MsrA adsorvida no GCE ocorre em três etapas consecutivas, dependentes de pH. A primeira etapa corresponde à oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano. Nesta primeira etapa de oxidação, o BDDE tem a vantagem de permitir a separação dos picos de oxidação do triptofano e da tirosina. Na segunda etapa ocorre a oxidação da histidina, e na terceira, a um potencial mais positivo, ocorre a segunda etapa da oxidação dos resíduos de triptofano.

Ao longo deste trabalho, os métodos voltamétricos revelaram-se ferramentas essenciais para a caracterização e a avaliação da transferência de electrão de vários compostos aromáticos, de aminoácidos e de proteínas, devido à capacidade de análise, em tempo real, dos processos que ocorrem na superfície do eléctrodo, contribuindo para uma melhor compreensão dos processos de interacção que ocorrem *in vivo*.

Relativamente ao estudo de transferência de electrões, o uso de eléctrodos de carbono permitiu a investigação rápida e de baixo custo de compostos de interesse biológico. As propriedades do BDDE, tais como a geração de radicais hidróxilo e a janela larga de potencial, abrem novas possibilidades de investigação na área da electroquímica e da electroanálise, possibilitando efectuar futuros estudos

electroquímicos que não são possíveis com outros eléctrodos. Neste contexto, a investigação de novos materiais de eléctrodos e eléctrodos modificados será também muito importante.

O trabalho efectuado demonstrou que as proteínas sofrem oxidação nos eléctrodos de carbono, sendo possível determinar o seu mecanismo de oxidação explorando as propriedades electroquímicas dos aminoácidos seus constituintes.

Relativamente às perspectivas futuras, a interacção das proteínas com a superfície dos eléctrodos é muito importante na construção de biossensores e dispositivos biomédicos, sendo este tópico um possível tema de investigação. A caracterização electroquímica com o BDDE irá permitir determinar o dano oxidativo causado às proteínas por radicais hidróxilo electrogerados *in situ* e investigar os mecanismos de transferência de electrão.

O futuro desenvolvimento deste trabalho aplicado ao estudo de proteínas poderá também passar pela investigação de outros processos bioquímicos associados, tais como a interacção das proteínas com iões, fármacos, nanopartículas e sequências de DNA, em complemento com outras técnicas de espectroscopia electroquímica de impedância, de microscopia atómica, de espectrofotometria ou de cromatografia.

Bibliografia

1. Enache, T.A. and Oliveira-Brett, A.M., Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *J Electroanal Chem*, 2011 **655**(1) 9-16.
2. Enache, A., Fatibello-Filho, O. and Oliveira-Brett, A.M., Electrochemical behavior of triflusal, aspirin and their metabolites at glassy carbon and boron doped diamond electrodes. *Com Chem High T Scr*. 2010 **13**(7) 569-577.
3. Enache, T.A. and Oliveira Brett, A.M., Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. *Electroanalysis*, 2011 **23**(6) 1337-1344.
4. Diculescu, V.C., et al., Electrochemical oxidation of berberine and of its oxidation products at a glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 2009 **21**(9) 1027-1034.
5. Diculescu, V.C., et al., Electrochemical oxidation of sanguinarine and of its oxidation products at a glassy carbon electrode—relevance to intracellular effects. *Electroanalysis*, 2010 **22**(1) 113-120.
6. Enache, T.A. and Oliveira-Brett, A.M., Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. *Bioelectrochemistry*, 2011 **81**(1) 46-52.
7. Enache, T.A., et al., Hydroxyl radicals electrochemically generated in situ on a boron-doped diamond electrode. *Electrochem Comm*, 2009 **11**(7) 1342-1345.
8. Vermerris, W. and Nicholson, R., *Phenolic compound biochemistry*. 2006: Springer Verlag.
9. Denisov, E.T., Afanasev, I.B. and Afanasev, I.B., *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. 2005: CRC.
10. Valko, M., et al., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007 **39**(1) 44-84.
11. Cristani, M., et al., Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agr Food Chem*, 2007 **55**(15) 6300-6308.
12. Martino, L., et al., Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Nat. Prod. Commun*, 2009 **4**(12) 1741-1750.
13. Sengul, M., et al., Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci*, 2009 **22**(1) 102-106.

14. Vaquero, M.J., Alberto, M.R. and de Nadra, M.C., Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Contr*, 2007 **18**(2) 93-101.
15. Özben, T., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants: pathological and physiological significance*. 1998: Springer.
16. Pereira, D.M., et al., Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 2009 **14**(6) 2202-2211.
17. Soobrattee, M.A., et al., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen*, 2005 **579**(1-2) 200-213.
18. Leopoldini, M., et al., Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J Phys Chem A*, 2004 **108**(22) 4916-4922.
19. Rappoport, Z. and Ebrary, I., *The chemistry of phenols*. 2003: Wiley New York.
20. Carey, F.A. and Sundberg, R.J., *Advanced organic chemistry: Structure and mechanisms*. 2007, NY: Springer Verlag.
21. Morrison, R. and Boyd, R., *Química Orgânica*, Fundação Calouste Gulbenkian. Portugal, 8a ed., 1639p, 1986.
22. Lowry, T.H. and Richardson, K.S., *Mechanism and theory in organic chemistry*. 1981: Harper & Row New York.
23. Schnepf, R., et al., Resonance Raman spectroscopic study of phenoxyl radical complexes. *J Am Chem Soc*, 1998 **120**(10) 2352-2364.
24. Malfoy, B. and Reynaud, J.A., Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives. *J Electroanal Chem*, 1980 **114**(2) 213-223.
25. Reynaud, J.A., Malfoy, B. and Canesson, P., Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine, cysteine, methionine. *J Electroanal Chem*, 1980 **114**(2) 195-211.
26. Andreescu, S., Andreescu, D. and Sadik, O.A., A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes. *Electrochem Comm*, 2003 **5**(8) 681-688.
27. Brabec, V. and Mornstein, V., Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes: II. Electrooxidation of amino acids. *Biophys Chem*, 1980 **12**(2) 159-165.
28. Janeiro, P. and Oliveira-Brett, A.M., Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Anal Chim Acta*, 2004 **518**(1-2) 109-115.
29. Janeiro, P. and Brett, A.M.O., Redox Behavior of Anthocyanins Present in *Vitis vinifera* L. *Electroanalysis*, 2007 **19**(17) 1779-1786.
30. Novak, I., Seruga, M. and Komorsky-Lovric, S., Square-wave and cyclic voltammetry of epicatechin gallate on glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem*, 2009 **631**(1-2) 71-75.
31. Boudenne, J.L., et al., Electrochemical oxidation of aqueous phenol at a carbon black slurry electrode. *Appl Catal Gen*, 1996 **143**(2) 185-202.

32. Shahrokhian, S. and Bozorgzadeh, S., Electrochemical oxidation of dopamine in the presence of sulfhydryl compounds: Application to the square-wave voltammetric detection of penicillamine and cysteine. *Electrochim Acta*, 2006 **51**(20) 4271-4276.
33. Notsu, H., Tatsuma, T. and Fujishima, A., Tyrosinase-modified boron-doped diamond electrodes for the determination of phenol derivatives. *J Electroanal Chem*, 2002 **523**(1-2) 86-92.
34. Iniesta, J., et al., Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode. *Electrochim Acta*, 2001 **46**(23) 3573-3578.
35. Nasr, B., et al., Electrochemical oxidation of hydroquinone, resorcinol, and catechol on boron-doped diamond anodes. *Environ Sci Tech*, 2005 **39**(18) 7234-7239.
36. Muñoz Álvarez, J.L., Calzón, J.A.G. and Fonseca, J.M.L., Square-wave voltammetry of the o-catechol-Ge (IV) catalytic system after adsorptive preconcentration at a hanging mercury drop electrode. *Talanta*, 2001 **53**(4) 721-731.
37. Chatzisyneon, E., et al., Anodic oxidation of phenol on Ti/IrO₂ electrode: Experimental studies. *Catal Today*, 2010 **151**(1-2) 185-189.
38. González Correa, J.A. and De La Cruz, J.P., Triflusal: An antiplatelet drug with a neuroprotective effect? *Cardiovasc Drug Rev*, 2006 **24**(1) 11-24.
39. Matias-Guiu, J., et al., Comparison of Triflusal and Aspirin for Prevention of Vascular Events in Patients After Cerebral Infarction: The TACIP Study: A Randomized, Double-Blind, Multicenter Trial* Can Aspirin Ever Be Surpassed for Stroke Prevention? *Stroke*, 2003 **34**(4) 840-848.
40. Costa, J., et al., Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005 **3** 2193-2195.
41. Cruz-Fernández, J.M., et al., Randomized comparative trial of triflusal and aspirin following acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2000 **21**(6) 457-465.
42. Bayón, Y., Alonso, A. and Crespo, M.S., 4 trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2 hydroxy 4 trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor B activation. *Br J Pharmacol*, 1999 **126**(6) 1359-1366.
43. Culebras, A., Borja, J. and García-Rafanell, J., Triflusal versus Aspirin for the Prevention of Stroke. *Progress in Neurotherapeutics and Neuropsychopharmacology*, 2008 **3**(1) 13-33.
44. Culebras, A., et al., Triflusal vs. aspirin for prevention of cerebral infarction. *Neurology*, 2004 **62**(7) 1073-1080.
45. Cho, H.Y., Jeong, T.J. and Lee, Y.B., Simultaneous determination of triflusal and its major active metabolite, 2-hydroxy-4-trifluoromethyl benzoic acid, in rat and human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chrom B*, 2003 **798**(2) 257-264.
46. Ferrit, M., del Valle, C. and Martínez, F., The study of the influence of surfactant charge on alkaline hydrolysis reactions of acetylsalicylic acid (ASA) and triflusal (TFL) using spectrophotometric methods. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2007 **31**(3-4) 211-220.

47. Sartori, E.R., et al., Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. *J. Braz. Chem. Soc*, 2009 **20**(2) 360-366.
48. Ivandic, B.T., et al., Determination of aspirin responsiveness by use of whole blood platelet aggregometry. *Clin Chem*, 2007 **53**(4) 614-619.
49. Batchelor-McAuley, C. and Wildgoose, G.G., The influence of substrate effects when investigating new nanoparticle modified electrodes exemplified by the electroanalytical determination of aspirin on NiO nanoparticles supported on graphite. *Electrochem Comm*, 2008 **10**(8) 1129-1131.
50. Dou, Y., et al., Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2007. **32**(3) 193-199.
51. Hammud, H.H., et al., Stability-Indicating Spectrofluorimetric and RP-HPLC Methods for the Determination of Aspirin and Dipyridamole in their Combination. *Open Spectros J*, 2008 **2** 19-28.
52. Supalkova, V., et al., Electrochemical sensors for detection of acetylsalicylic acid. *Sensors*, 2006 **6**(11) 1483-1497.
53. Torriero, A.A.J., et al., Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta*, 2004 **62**(2) 247-254.
54. Albarran, G. and Schuler, R.H., Concerted effects in the reaction of [radical sign] OH radicals with aromatics: radiolytic oxidation of salicylic acid. *Radiat Phys Chem*, 2003 **67**(3-4) 279-285.
55. Ai, S., et al., Study on production of free hydroxyl radical and its reaction with salicylic acid at lead dioxide electrode. *J Electroanal Chem*, 2005 **578**(2) 223-229.
56. Argemí, A., et al., Spectroscopic and chromatographic characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation technologies. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2008 **46**(3) 456-462.
57. Weber, E., Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*. 1995.
58. Somers, K.R.F., Kryachko, E.S. and Ceulemans, A., Theoretical study of indole: protonation, indolyl radical, tautomers of indole, and its interaction with water. *Chem Phys*, 2004 **301**(1) 61-79.
59. Van Order, R.B. and Lindwall, H.G., Indole. *Chem Rev*, 1942 **30**(1) 69-96.
60. Lassmann, G., et al., Electronic structure of a transient histidine radical in liquid aqueous solution: EPR continuous-flow studies and density functional calculations. *J Phys Chem A*, 1999 **103**(9) 1283-1290.
61. Sundberg, R.J., *The chemistry of indoles*. 1970: Academic Press New York.
62. Perrot-Rechenmann, C. and Hagen, G., *Auxin molecular biology*. 2002: Kluwer Academic Publishers.
63. Rani, P., Srivastava, V.K. and Kumar, A., Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives. *Eur J Med Chem*, 2004 **39**(5) 449-452.

64. Radwan, M.A.A., et al., Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. *Bioorg Med Chem*, 2007 **15**(11) 3832-3841.
65. Palluotto, F., et al., Synthesis and antibacterial activity of pyridazino [4, 3-b] indole-4-carboxylic acids carrying different substituents at N-2. *Il Farmaco*, 2002 **57**(1) 63-69.
66. Ryu, C.K., et al., Synthesis and antifungal activity of 1H-indole-4, 7-diones. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007 **17**(1) 127-131.
67. Bendheim, P.E., et al., Development of indole-3-propionic acid (OXIGON™) for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, 2002 **19**(1) 213-217.
68. Chyan, Y.J., et al., Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J Biol Chem*, 1999 **274**(31) 21937-21942.
69. Andreani, A., et al., Antitumor Activity of Bis-indole Derivatives (1). *J. Med. Chem*, 2008. **51**(15) 4563-4570.
70. Bradlow, H.L., et al., Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, 1991 **12**(9) 1571-1574.
71. Queiroz, M., et al., Synthesis of new heteroaryl and heteroannulated indoles from dehydrophenylalanines: Antitumor evaluation. *Bioorg Med Chem*, 2008 **16**(10) 5584-5589.
72. Tan, D.X., et al., Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, 2002 **2**(2) 181-197.
73. Wu, K., Sun, Y. and Hu, S., Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode. *Sensor Actuator B Chem*, 2003 **96**(3) 658-662.
74. Diculescu, V.C., Kumbhat, S. and Oliveira-Brett, A.M., Electrochemical behaviour of isatin at a glassy carbon electrode. *Anal Chim Acta*, 2006 **575**(2) 190-197.
75. Hu, T. and Dryhurst, G., Electrochemical oxidation of indole-3-acetic acid: mechanisms and products formed in acidic medium. *J Electroanal Chem*, 1993 **362**(1-2) 237-248.
76. Hu, T. and Dryhurst, G., Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. *J Electroanal Chem*, 1997 **432**(1-2) 7-18.
77. Goyal, R.N. and Sangal, A., Oxidation chemistry of indole-2-carboxylic acid: Mechanism and products formed in neutral aqueous solution. *Electrochim Acta*, 2005 **50**(10) 2135-2143.
78. Goyal, R.N., Kumar, N. and Singhal, N.K., Oxidation chemistry and biochemistry of indole and effect of its oxidation product in albino mice. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998 **45**(1) 47-53.
79. Radi, A. and Bekhiet, G.E., Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998 **45**(2) 275-279.
80. Keech, P.G., Chartrand, M.M.G. and Bunce, N.J., Oxidation of simple indoles at a platinum anode. *J Electroanal Chem*, 2002 **534**(1) 75-78.

81. Keech, P.G. and Bunce, N.J., Electrochemical oxidation of simple indoles at a PbO₂ anode. *J Appl Electrochem*, 2003 **33**(1) 79-83.
82. Uslu, B. and Canbaz, D., Anodic voltammetry of zolmitriptan at boron-doped diamond electrode and its analytical applications. *Pharmazie*, 2010 **65**(4) 245-250.
83. Bozkaya, P., et al., Determination and investigation of electrochemical behaviour of 2-phenylindole derivatives: Discussion on possible mechanistic pathways. *Can J Anal Sci Spec*, 2006 **51**(3) 125-139.
84. Saraji, M. and Bagheri, A., Electropolymerization of indole and study of electrochemical behavior of the polymer in aqueous solutions. *Synthetic Met*, 1998 **98**(1) 57-63.
85. Udum, Y.A., Düdükçü, M. and Köleli, F., Electrochemical polymerization and spectroscopic investigation of 2-methylindole. *React Funct Polym*, 2008 **68**(4) 861-867.
86. Talbi, H. and Billaud, D., Electrochemical properties of polyindole and poly (5-cyanoindole) in LiClO₄-acetonitrile and in HCl and HClO₄ solutions. *Synthetic Met*, 1998 **93**(2) 105-110.
87. Eun, J.P. and Koh, G.Y., Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004 **317**(2) 618-624.
88. Mitscher, L.A., et al., Antimicrobial agents from higher plants. An investigation of *Hunnemannia fumariaefolia* pseudoalcoholates of sanguinarine and chelerythrine. *Lloydia*, 1978 **41**(2) 145-150.
89. Lenfeld, J., et al., Antiinflammatory Activity of Quaternary Benzophenanthridine Alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med*, 1981 **43**(10) 161-165.
90. Vavreckova, C., et al., Effect of quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine and fagaronine on some mammalian cells. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 1994 **138** 7-10.
91. Vavreková, C., Gawlik, I., and Müller, K., Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med*, 1996 **62**(5) 397-401.
92. Küpeli, E., et al., A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci*, 2002 **72**(6) 645-657.
93. Milhazes, N., et al., Electrochemical and spectroscopic characterisation of amphetamine-like drugs: Application to the screening of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its synthetic precursors. *Anal Chim Acta*, 2007 **596**(2) 231-241.
94. Hiramatsu, M., et al., Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Therapeut*, 1990 **254**(2) 521-527.
95. Lin, L.Y., Kumagai, Y. and Cho, A.K., Enzymic and chemical demethylenation of (methylenedioxy) amphetamine and (methylenedioxy) methamphetamine by rat brain microsomes. *Chem Res Toxicol*, 1992 **5**(3) 401-406.

96. Macedo, C., et al., Synthesis and cyclic voltammetry studies of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) human metabolites. *J Health Sci*, 2007 **53**(1) 31-42.
97. Iwasa, K., et al., Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity. *Eur J Med Chem*, 1999 **34**(12) 1077-1083.
98. Suau, R., Nájera, F. and Rico, R., Hydroxymethylation of protoberberine alkaloids by photoinduced SET. The total synthesis of ()-solidaline. *Tetrahedron*, 1999 **55**(13) 4019-4028.
99. Grycová, L., Dostal, J. and Marek, R., Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 2007 **68**(2) 150-175.
100. Tousek, J., et al., Configurations and conformations of sanguinarine and chelerythrine free bases stereoisomers. *J Mol Struct*, 2002 **613**(1-3) 103-113.
101. Vrba, J., et al., Sanguinarine is a potent inhibitor of oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells by a non-redox mechanism. *Chem Biol Interact*, 2004 **147**(1) 35-47.
102. Holy, J., Lamont, G. and Perkins, E., Disruption of nucleocytoplasmic trafficking of cyclin D 1 and topoisomerase II by sanguinarine. *BMC Cell Biol*, 2006 **7**(1) 13-26.
103. Ghosh, A.K., Bhattacharyya, F.K. and Ghosh, D.K., Leishmania donovani: Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol*, 1985 **60**(3) 404-413.
104. Birdsall, T.C. and Kelly, G.S., Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev*, 1997 **2**(2) 94-104.
105. Fukuda, K., et al., Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol*, 1999 **66**(2) 227-233.
106. Kuo, C.L., Chou, C.C. and Yung, B.Y.M., Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Canc Lett*, 1995 **93**(2) 193-200.
107. Szeto, S., Yow, C.M.N. and Fung, K.W., Characterization of Berberine on Human Cancer Cells in Culture. *Turk J Med Sci*, 2002 **32**(5) 363-368.
108. Iizuka, N., et al., Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Canc Lett*, 2000 **148**(1) 19-25.
109. Zhang, R.X., Dougherty, D.V. and Rosenblum, M.L., Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors. *Chin Med J*, 1990 **103**(8) 658-665.
110. Mazzini, S., Bellucci, M.C. and Mondelli, R., Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide d (AAGAATTCTT) 2. *Bioorg Med Chem*, 2003 **11**(4) 505-514.
111. Meeran, S.M., Katiyar, S. and Katiyar, S.K., Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008 **229**(1) 33-43.
112. Creasey, W.A., Biochemical effects of berberine. *Biochem Pharmacol*, 1979 **28**(7) 1081-1084.

113. Schmeller T., Latz-Brüning, B. and Wink, M., Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 1997 **44**(2) 257-266.
114. Lau, C.W., et al., Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc Drug Rev*, 2001 **19**(3) 234-244.
115. Choi, M.S.U.K., et al., Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. *Anticancer Res*, 2008 **28**(6A) 3777-3784.
116. Kong, W.J., et al., Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism*, 2009 **58**(1) 109-119.
117. Serafim, T.L., et al., Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. *Canc Chemother Pharmacol*, 2008 **61**(6) 1007-1018.
118. Pereira, G.C., et al., Mitochondrially targeted effects of berberine [Natural Yellow 18, 5, 6-dihydro-9, 10-dimethoxybenzo (g)-1, 3-benzodioxolo (5, 6-a) quinolizinium] on K1735-M2 mouse melanoma cells: comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions. *J Pharmacol Exp Therapeut*, 2007 **323**(2) 636-649.
119. Pereira, C.V., Machado, N.G. and Oliveira, P.J., Mechanisms of Berberine (Natural Yellow 18)-Induced Mitochondrial Dysfunction: Interaction with the Adenine Nucleotide Translocator. *Toxicol Sci*, 2008 **105**(2) 408-417.
120. Tsai, T.H., Analytical approaches for traditional Chinese medicines exhibiting antineoplastic activity. *J Chrom B Biomed Sci Appl*, 2001 **764**(1-2) 27-48.
121. Yu, S., et al., A sensitive and specific liquid chromatography mass spectrometry method for simultaneous determination of berberine, palmatine, coptisine, epiberberine and jatrorrhizine from *Coptidis Rhizoma* in rat plasma. *Int J Mass Spectrom*, 2007 **268**(1) 30-37.
122. Song, Z., et al., Chemiluminescence flow sensor for berberine with immobilized reagents. *Bioorg Med Chem*, 2001 **9**(7) 1701-1705.
123. Yang, Y., et al., Optical sensor for berberine utilizing its intrinsic fluorescence enhanced by the formation of inclusion complex with butylated-[beta]-cyclodextrin. *Anal Chim Acta*, 2004 **513**(2) 385-392.
124. Hsieh, F.Y.L., Cai, J. and Henion, J., Determination of trace impurities of peptides and alkaloids by capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry. *J Chrom*, 1994 **679**(1) 206-211.
125. Komorsky-Lovric, S. and Lovric, M., Reactant adsorption in pulse polarography: Part III. Quasi-reversible charge transfers. *J Electroanal Chem*, 1985 **190**(1-2) 1-20.
126. Komorsky-Lovric, S., Square-wave voltammetry of berberine. *J Electroanal Chem*, 1987 **219**(1-2) 281-289.
127. Chung, Y.L., et al., Fluorescence enhancement for alkaloids by anions: Spectroscopic and electrochemical characterizations. *J Electroanal Chem*, 2007 **610**(1) 85-89.
128. Dvorak, Z., et al., Cytotoxicity of sanguinarine in primary rat hepatocytes is attenuated by dioxin and phenobarbital. *Toxicol Lett*, 2006 **165**(3) 282-288.

129. Ahsan, H., et al., Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins. *Canc Lett*, 2007 **249**(2) 198-208.
130. Godowski, K.C., et al., Whole mouth microbiota effects following subgingival delivery of sanguinarium. *J Periodontol*, 1995 **66**(10) 870-877.
131. Harper, D.S., et al., Effect of 6 months use of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride upon the microflora of the dental plaque and oral soft tissues. *J Periodontol*, 1990 **61**(6) 359-363.
132. Colombo, M.L. and Bosisio, E., Pharmacological activities of chelidonium majus L. (papaveraceae). *Pharmacol Res*, 1996 **33**(2) 127-134.
133. Reagan-Shaw, S., Breur, J. and Ahmad N., Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Mol Canc Therapeut*, 2006 **5**(2) 418-429.
134. Matkar, S.S., Wrischnik, L.A. and Hellmann-Blumberg, U., Sanguinarine causes DNA damage and p53-independent cell death in human colon cancer cell lines. *Chem Biol Interact*, 2008 **172**(1) 63-71.
135. Das, A., Mukherjee, A. and Chakrabarti, J., Sanguinarine: an evaluation of in vivo cytogenetic activity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2004 **563**(1) 81-87.
136. Chang, M.C., et al., Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007 **218**(2) 143-151.
137. Malikova, J., Zdarilova, A. and Hlobilkova, A., Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2006 **150**(1) 5-12.
138. Philchenkov, A., et al., Apoptogenic activity of two benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* L. does not correlate with their DNA damaging effects. *Toxicol Vitro*, 2008 **22**(2) 287-295.
139. Wolff, J. and Knipling, L., Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry*, 1993 **32**(48) 13334-13339.
140. Weerasinghe, P., Hallock, S. and Liepins, A., Bax, Bcl-2, and NF- κ B Expression in Sanguinarine Induced Bimodal Cell Death. *Exp Mol Pathol*, 2001 **71**(1) 89-98.
141. Kaminsky, V., et al., Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. *Cell Biol Int*, 2008 **32**(2) 271-277.
142. Giri, P. and Kumar, G.S., Spectroscopic and calorimetric studies on the binding of the phototoxic and cytotoxic plant alkaloid sanguinarine with double helical poly (A). *J Photochem Photobiol Chem*, 2008 **194**(2-3) 111-121.
143. Ansari, K.M., et al., In vivo DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. *Food Chem Toxicol*, 2005 **43**(1) 147-153.

144. Stiborová, M., DNA adduct formation from quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine as revealed by the ³²P-postlabeling technique. *Chem Biol Interact*, 2002 **140**(3) 231-242.
145. Serafim, T.L., et al., Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells-- Nuclear vs. mitochondrial effects. *Biochem Pharmacol*, 2008 **76**(11) 1459-1475.
146. Suchomelová, J., et al., HPLC quantification of seven quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2007 **44**(1) 283-287.
147. Liu, Q., et al., A simple and sensitive method of nonaqueous capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for the analysis of chelerythrine and sanguinarine in Chinese herbal medicines. *Talanta*, 2006 **70**(1) 202-207.
148. Vespalec, R., Vlkova, M. and Horáková, H., Aggregation and other intermolecular interactions of biological buffers observed by capillary electrophoresis and UV photometry. *J Chrom*, 2004 **1051**(1-2) 75-84.
149. Bansal, A.K., Singh, P.J. and Sharma, K.S., Structural study of rapeseed-mustard variety PCR-7 oil-argemone-mexicana oil blend by dielectric relaxation studies. *J Mol Liq*, 2002 **95**(1) 51-62.
150. Pinzauti, S., et al., Differential pulse polarographic determination of total benzophenanthridinium alkaloids in Sanguinaria extract-based oral rinses. *Int J Pharm*, 1988 **46**(3) 255-260.
151. Hrbac, J., et al., Electrochemistry of Benzophenanthridine Alkaloids. Formation and Characterization of Redox Active Films from Products of Sanguinarine and Chelerythrine Oxidation. *Electroanalysis*, 2005 **17**(23) 2175-2181.
152. Davies, J.S., *Amino acids, peptides, and proteins*. Vol. 30. 1999: Royal society of chemistry.
153. Kyte, J. and Doolittle, R.F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein* 1. *J Mol Biol*, 1982 **157**(1) 105-132.
154. Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W., *Fundamentals of biochemistry*. 1999: Wiley New York.
155. Whitford, D., *Proteins: structure and function*. 2005: Wiley.
156. Echols, N., et al., Comprehensive analysis of amino acid and nucleotide composition in eukaryotic genomes, comparing genes and pseudogenes. *Nucleic Acids Res*, 2002 **30**(11) 2515-2523.
157. Chiku, M., et al., Electrochemical detection of tyrosine derivatives and protein tyrosine kinase activity using boron-doped diamond electrodes. *Biosens Bioelectron*, 2010 **26**(1) 235-240.
158. Chen, L.C., Chang, C.C. and Chang, H.C., Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution. *Electrochim Acta*, 2008 **53**(6) 2883-2889.
159. Spătaru, N., et al., Voltammetric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes. *Anal Chem*, 2001 **73**(3) 514-519.

160. Ralph, T.R., et al., The electrochemistry of l-cystine and l-cysteine part 2: Electrosynthesis of l-cysteine at solid electrodes. *J Electroanal Chem*, 1994 **375**(1-2) 17-27.
161. Shaidarova, L.G., Ziganshina, S.A. and Budnikov, G.K., Electrocatalytic oxidation of cysteine and cystine at a carbon-paste electrode modified with ruthenium (IV) oxide. *J Anal Chem*, 2003 **58**(6) 577-582.
162. Zhou, M., et al., Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode. *Anal Chem*, 2007 **79**(14) 5328-5335.
163. Gao, Z.N., Yao, H.Q. and Liu, W.Y., Study on Electrocatalytic Oxidation of L Cysteine at Glassy Carbon Electrode by (FcM) TMA and Its Electrochemical Kinetics. *Electroanalysis*, 2005 **17**(7) 619-624.
164. Ardakani, M.M., et al., Electrocatalytic oxidation of cysteine by quinizarine at glassy carbon electrode. *Sensor Actuator B Chem*, 2007 **123**(2) 763-768.
165. Brabec, V., Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects. *J Electroanal Chem*, 1980 **7**(1) 69-82.
166. Brabec, V. and Mornstein, V., Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. *Biochim Biophys Acta Protein Struct*, 1980 **625**(1) 43-50.
167. Reynaud, J.A., Malfoy, B. and Bere, A., The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes. *J Electroanal Chem*, 1980 **116** 595-606.
168. <http://www.genome.gov>
169. Weir, B.S., *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. 1990, Sinauer Associates, Inc. Publishers.
170. <http://www.pdb.org>
171. Weber, A.L. and Miller, S.L., Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol*, 1981 **17**(5) 273-284.
172. Brooks, D.J., et al., Evolution of amino acid frequencies in proteins over deep time: inferred order of introduction of amino acids into the genetic code. *Mol Biol Evol*, 2002 **19**(10) 1645-1655.
173. Hermanson, G.T., *Bioconjugate techniques*. 2008: Academic Pr, Amsterdam, The Netherlands.
174. Stadtman, E.R. and Levine, R.L., Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 2003 **25**(3) 207-218.
175. Stadtman, E.R., Protein oxidation and aging. *Science*, 1992 **257**(5074) 1220-1224.
176. Schwarzenbach, R.P., et al., *Environmental organic chemistry*. 2003: Wiley Online Library.
177. Jones, D.P., Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008 **295**(4) C849-C868.

178. Stadtman, E.R., et al., Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta Protein Proteonomics*, 2005 **1703**(2) 135-140.
179. Stadtman, E.R., Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*, 1993 **62**(1) 797-821.
180. Berlett, B.S. and Stadtman, E.R., Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 1997 **272**(33) 20313-6.
181. Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabol Rev*, 2000 **32**(3-4) 307-326.
182. Jones, D.P., et al., Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *Faseb J*, 2004 **18**(11) 1246-8.
183. Turell, L., et al., Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol Res*, 2009 **42**(4) 305-311.
184. Štolc, S., Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sci*, 1999 **65**(18-19) 1943-1950.
185. Vogt, W., Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med*, 1995 **18**(1) 93-105.
186. Jacob, C., et al., Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed*, 2003 **42**(39) 4742-4758.
187. Stadtman, E.R., et al., Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol Cell Biochem*, 2002 **234**(1) 3-9.
188. Chao, C.C., Ma, Y.S. and Stadtman, E.R., Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc Natl Sci Acad USA*, 1997 **94**(7) 2969-2974.
189. Hoshi, T. and Heinemann, S.H., Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol*, 2001 **531**(1) 1-11.
190. C.M. Mathews, *Molecular architecture of living matter – nucleic acids, in Biochemistry*. 1990, The Benjamin/Cummings Publishing Company: 390 Bridge Parkway, Redwood City, CA.
191. Kuschel, L., et al., Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS Lett*, 1999 **456**(1) 17-21.
192. Levine, R.L., Moskovitz, J. and Stadtman E.R., Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *Iubmb Life*, 2001 **50**(4) 301-307.
193. Weissbach, H., et al., Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch Biochem Biophys*, 2002 **397**(2) 172-178.
194. Weissbach, H., Resnick, L. and Brot, N., Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta Protein Proteonomics*, 2005 **1703**(2) 203-212.
195. Moskovitz, J., et al., Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol*, 1995 **177**(3) 502-7.

196. Sadanandom, A., et al., Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2000 **123**(1) 255-264.
197. Moskovitz, J., et al., Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Sci Acad USA*, 2001 **98**(23) 12920-5.
198. Kauffmann, B., Aubry, A. and Favier, F., The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases: current knowledge and open questions. *Biochim Biophys Acta Protein Proteomics*, 2005 **1703**(2) 249-260.
199. Burrows, A.L., et al., Direct electrochemistry of proteins. *Eur J Biochem*, 1991 **202**(2) 543-549.
200. Ghica, M.E. and Brett, C.M.A., Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly (neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples. *Electroanalysis*, 2006 **18**(8) 748-756.
201. Ghica, M.E., et al., Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors. *Sensor Actuator B Chem*, 2009 **142**(1) 308-315.
202. Palecek, E., et al., Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA. *Anal. Chem*, 2004 **76**(19) 5930-5936.
203. Pauliukaite, R., et al., Characterisation of poly (neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors. *J Solid State Electrochem*, 2007 **11**(7) 899-908.
204. Armstrong, F.A., Hill, H.A.O. and Walton, N.J., Direct electrochemistry of redox proteins. *Accounts Chem Res*, 1988 **21**(11) 407-413.
205. Chiku, M., et al., Direct electrochemical oxidation of proteins at conductive diamond electrodes. *J Electroanal Chem*, 2008 **612**(2) 201-207.
206. Hu, N., Direct electrochemistry of redox proteins or enzymes at various film electrodes and their possible applications in monitoring some pollutants. *Pure Appl Chem*, 2001 **73**(12) 1979-1992.
207. Wong, T.S. and Schwaneberg, U., Protein engineering in bioelectrocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003 **14**(6) 590-596.
208. Guo, C., et al., Direct electrochemistry of hemoglobin on carbonized titania nanotubes and its application in a sensitive reagentless hydrogen peroxide biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2008 **24**(4) 819-824.
209. Lisdat, F., et al., Self-assembly of electro-active protein architectures on electrodes for the construction of biomimetic signal chains. *Chem Comm*, 2009 **3** 274-283.
210. Cai, C. and Chen, J., Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of hemoglobin at a carbon nanotube electrode. *Anal Biochem*, 2004 **325**(2) 285-292.
211. Zhang, Y., He, P. and Hu, N., Horseradish peroxidase immobilized in TiO₂ nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis. *Electrochim Acta*, 2004 **49**(12) 1981-1988.

212. Barton, S.C., Gallaway, J. and Atanassov, P., Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chem. Rev*, 2004 **104**(10) 4867-4886.
213. Ahmed, M.U., Hossain, M.M. and Tamiya, E., Electrochemical biosensors for medical and food applications. *Electroanalysis*, 2008 **20**(6) 616-626.
214. Zhang, H., et al., Ultrasensitive assays for proteins. *Analyst*, 2007 **132**(8) 724-737.
215. Pavskia, V. and Le, X.C., Ultrasensitive protein–DNA binding assays. *Curr Opin Biotechnol*, 2003 **14**(1) 65-63.
216. Zhang, L., et al., Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the direct electrochemistry and electrocatalytic behavior of hemoglobin. *Biosens Bioelectron*, 2005 **21**(2) 337-345.
217. Gray, J.J., The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol*, 2004 **14**(1) 110-115.
218. Hlady, V. and Buijs, J., Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol*, 1996 **7**(1) 72-77.
219. Wahlgren, M. and Arnebrant, T., Protein adsorption to solid surfaces. *Trends Biotechnol*, 1991 **9**(1) 201-208.
220. Shen, L., Huang R. and Hu, N., Myoglobin in polyacrylamide hydrogel films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis. *Talanta*, 2002 **56**(6) 1131-1139.
221. Fultz, M.L. and Durst, R.A., Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. *Anal Chim Acta*, 1982 **140**(1) 1-18.
222. Crespilho, F.N., et al., Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. *J Phys Chem B*, 2006 **110**(35) 17478-17483.
223. Frew, J.E. and Hill, H.A.O., Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins. *Eur J Biochem*, 1988 **172**(2) 261-269.
224. Baymann, F., et al., Voltammetry of a 'protein on a rope'. *FEBS Lett*, 2003 **539**(1-3) 91-94.
225. Palecek, E., Scheller, F. and Wang, J., *Electrochemistry of nucleic acids and proteins: towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*. 2005: Elsevier Science Ltd.
226. Barker, P.D. and Mauk, A.G., pH-Linked conformational regulation of a metalloprotein oxidation-reduction equilibrium: electrochemical analysis of the alkaline form of cytochrome c. *J Am Chem Soc*, 1992 **114**(10) 3619-3624.
227. Davis, J.J., Hill, H.A.O. and Bond, A.M., The application of electrochemical scanning probe microscopy to the interpretation of metalloprotein voltammetry. *Coord Chem Rev*, 2000 **200-202** 411-442.
228. Kennedy, M.L. and Gibney B.R., Metalloprotein and redox protein design. *Curr Opin Struct Biol*, 2001 **11**(4) 485-490.
229. Wang, J., Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review. *Electroanalysis*, 2005 **17**(1) 7-14.

230. Wang, J., Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta*, 2002 **56**(2) 223-231.
231. Bistolas, N., et al., Cytochrome P450 biosensors--a review. *Biosens Bioelectron*, 2005 **20**(12) 2408-2423.
232. Zhang, M., Mullens, C. and Gorski, W., Insulin oxidation and determination at carbon electrodes. *Anal Chem*, 2005 **77**(19) 6396-6401.
233. Zong, W., et al., Cyclic voltammetry: A new strategy for the evaluation of oxidative damage to bovine insulin. *Protein Sci*, 2009 **19**(2) 263-268.
234. Permentier, H.P. and Bruins, A.P., Electrochemical oxidation and cleavage of proteins with on-line mass spectrometric detection: Development of an instrumental alternative to enzymatic protein digestion. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004 **15**(12) 1707-1716.
235. Zhou, N., et al., Electrochemical Assay of Human Islet Amyloid Polypeptide and Its Aggregation. *Sensors*, 2008 **8**(9) 5987-5995.
236. Ishizaki, M. and Oka, Y., Amperometric recording of gonadotropin-releasing hormone release activity in the pituitary of the dwarf gourami (teleost) brain-pituitary slices. *Neurosci Lett*, 2001 **299**(1-2) 121-124.
237. Tomschik, M., et al., Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis*, 1998 **10**(6) 403-409.
238. Brett, C.M.A. and Brett, A.M.O., *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. 1993: Oxford University Press Oxford.
239. Pavone, P., et al., Ab initio lattice dynamics of diamond. *Phys Rev B*, 1993 **48**(5) 3156-3163.
240. Iwaki, M., et al., Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. *Nucl Instrum Meth Phys Res*, 1983 **209** 1129-1133.
241. Kondo, T., et al., Characterization and electrochemical properties of CF₄ plasma-treated boron-doped diamond surfaces. *Diam Relat Mater*, 2008 **17**(1) 48-54.
242. Swain, G.M. and Ramesham, R., The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Anal Chem*, 1993 **65**(4) 345-351.
243. Swain, G.M., The use of CVD diamond thin films in electrochemical systems. *Adv Mater*, 1994 **6**(5) 388-392.
244. Martin, H.B., et al., Hydrogen and oxygen evolution of boron-doped diamond electrodes. *J Electrochem Soc*, 1996 **143**(6) L133-L136.
245. Martin, H.B., et al., Voltammetry studies of single-crystal and polycrystalline diamond electrodes. *J Electrochem Soc*, 1999 **146**(8) 2959-2964.
246. Kapalka, A., Fóti, G. and Comninellis, C., Investigations of electrochemical oxygen transfer reaction on boron-doped diamond electrodes. *Electrochim Acta*, 2007 **53**(4) 1954-1961.
247. Kapalka, A., Foti, G. and Comninellis, C., The importance of electrode material in environmental electrochemistry:: Formation and reactivity of free hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes. *Electrochim Acta*, 2009 **54**(7) 2018-2023.

248. Kapalka, A., Fóti, G. and Comninellis, C., Determination of the Tafel slope for oxygen evolution on boron-doped diamond electrodes. *Electrochem Comm*, 2008 **10**(4) 607-610.
249. Kapalka, A., et al., Electrochemically induced mineralization of organics by molecular oxygen on boron-doped diamond electrode. *Electrochem Comm*, 2008 **10**(9) 1215-1218.
250. Compton, R.G., Foord, J.S. and Marken, F., Electroanalysis at Diamond Like and Doped Diamond Electrodes. *Electroanalysis*, 2003 **15**(17) 1349-1363.
251. Comninellis, C., Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochim Acta*, 1994 **39**(11-12) 1857-1862.
252. Marselli, B., et al., Electrogenation of hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes. *J Electrochem Soc*, 2003 **150**(3) D79-D83.
253. Ma, J. and Graham, N.J.D., Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation--influence of radical scavengers. *Water Res*, 2000 **34**(15) 3822-3828.
254. Ji, X., Banks, C.E. and Compton, R.G., The electrochemical oxidation of ammonia at boron-doped diamond electrodes exhibits analytically useful signals in aqueous solutions. *Analyst*, 2005 **130**(10) 1345-1347.
255. Sabry, S. M., Wahbi, A. M., Application of orthogonal functions to differential pulse voltammetric analysis. Simultaneous determination of tin and lead in soft drinks, *Anal Chem Acta*, 1999, **401** 173-183.

