UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ROBSON PINHO DA SILVA

Comportamento Redox e Detecção Voltamétrica de Neurotransmissores, Nitrito, Derivados Purínicos e Nitrofural em Sensores Eletroquímicos à Base de Carbono

Nº USP: 2245185

N° Processo: 142353/2007-8

Orientador: Prof. Dr. Sílvia Helena Pires Serrano

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/09/2012

ROBSON PINHO DA SILVA

Comportamento Redox e Detecção Voltamétrica de Neurotransmissores, Nitrito, Derivados Purínicos e Nitrofural em Sensores Eletroquímicos à Base de Carbono

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Sílvia Helena Pires Serrano

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Robson Pinho da
P654c Comportamento redox e detecção voltamétrica de neurotransmissores, nitrito, derivados purínicos e nitrofural em sensores eletroquímicos a base de carbono / Robson Pinho da Silva. -- São Paulo, 2012.
154p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Serrano, Sílvia Helena Pires

1. Métodos eletroanalíticos : Química analítica 2. Voltametria : Química analítica 3. Carbono : Eletrodo 4. Nitrito : Química analítica : Inorgânica 5. DNA : Lesão I. T. II. Serrano, Sílvia Helena Pires, orientador.

543.0871 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Comportamento redox e detecção voltamétrica de neurotransmissores, nitrito, derivados purínicos e nitrofural em sensores eletroquímicos à base de carbono"

ROBSON PINHO DA SILVA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Mauro Bertotti
IQ - USP

Prof. Dr. Thiago Regis Longo César da Paixão
IQ - USP

Prof. Dr. Hideko Yamanaka
IQ - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. Murilo Sérgio da Silva Julião
UVA

SÃO PAULO
26 de outubro de 2012

Dedico esta tese ás Árvores:

Meus filhos Elis Ayumi e Miguel Akira

Simbolizando os frutos, pois além de doces,

Me dão força e me enchem de vida.

Minha esposa Carolina as flores e as folhas

Que além de seu perfume,

Me dá abrigo e me faz respirar.

Todos os meus familiares o tronco,

Que além de me dar suporte e sustentação

Guiam-me sempre para o céu.

E todos os meus amigos as raízes,

que perto ou longe, se chegando ou se saindo

ou mesmo se já se foram,

formam o meu caráter.

Em memória de João Vitor Bueno Kozan e

Dona Laura da Conceição Serrano.

AGRADECIMENTO(S)

À Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano pela ORIENTAÇÃO e grata amizade.

Aos Prof. Dr. Antônio William Oliveira Lima pela valiosa colaboração neste trabalho.

Aos Profs. Drs. Mauro Bertotti e Lúcio Angnes, pelas ótimas discussões e contribuições durante a qualificação.

A todos os Profs. do IQ-USP, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta tese.

A todos os professores da Química Analítica em especial aos Profs. Drs. Claudimir Lago, Jivaldo R. Matos, Jorge Masini, Lúcio Angnes, Marina Franco, Mauro Bertotti, Nina Coichev, Paulo Celso, Pedro Vitoriano e Roberto Tokoro, pelas aquisições de conhecimentos por cursos por eles ministrados.

Aos meus professores de inglês Érico e Amauri pela orientação nas provas de proficiência. E a Carolina Tomoi na ajuda para digitação e formatação desta tese.

Aos colegas de laboratório, Fernando C. M. Oliveira (Caracol), Rafael M Buoro (Rafão), Raphael Bacil (Batatinha), Luis Carlos Cides (Mouro), Mauro, Lúcia, Cristina, Nívea e Fátima pela amizade e pelas boas risadas.

A todos os colegas do Instituto de Química pela amizade e momentos de descontração.

Agradecimento a todos os funcionários da Química Analítica

Aos colegas, professores e funcionários do Instituto de Química, pelo agradável convívio. Em especial para Cibele, Milton, Marcelo (pós-graduação), Jailton (fotocópias), Mirian e Maria (Copa).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelos auxílios concedidos, como a bolsa de Doutorado.

As Aventuras De Raul Seixas na Cidade de Thor

Raul Seixas

Tá rebocado meu compadre
Como os donos do mundo piraram
Eles já são carrascos e vítimas
Do próprio mecanismo que criaram

O monstro SIST é retado
E tá doido pra transar comigo
E sempre que você dorme de touca
Ele fatura em cima do inimigo

A arapuca está armada
E não adianta de fora protestar
Quando se quer entrar
Num buraco de rato
De rato você tem que transar

Buliram muito com o planeta
E o planeta como um cachorro eu vejo
Se ele já não aguenta mais as pulgas
Se livra delas num sacolejo

Hoje a gente já nem sabe
De que lado estão certos cabeludos
Tipo estereotipado
Se é da direita ou dá traseira
Não se sabe mais lá de que lado

Eu que sou vivo pra cachorro
No que eu estou longe eu tô perto
Se eu não estiver com Deus, meu filho
Eu estou sempre aqui com o olho aberto

A civilização se tornou complicada
Que ficou tão frágil como um computador
Que se uma criança descobrir
O calcanhar de Aquiles
Com um só palito pára o motor

Tem gente que passa a vida inteira
Travando a inútil luta com os galhos
Sem saber que é lá no tronco
Que está o coringa do baralho

Quando eu compus fiz Ouro de Tolo
Uns imbecis me chamaram de profeta do apocalipse
Mas eles só vão entender o que eu falei
No esperado dia do eclipse

Acredite que eu não tenho nada a ver
Com a linha evolutiva da Música Popular Brasileira
A única linha que eu conheça
É a linha de empinar uma bandeira

Eu já passei por todas as religiões
Filosofias, políticas e lutas
Aos 11 anos de idade eu já desconfiava
Da verdade absoluta

Raul Seixas e Raulzito
Sempre foram o mesmo homem
Mas pra aprender o jogo dos ratos
Transou com Deus e com o lobisomem

RESUMO

Silva, R. P. **"Comportamento Redox e Detecção Voltamétrica de Neurotransmissores, Nitrito, Derivados Purínicos e Nitrofural em Sensores Eletroquímicos a Base de Carbono"**. 2012. Número de páginas do trabalho 154 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sistemas químicos capazes de produzir radicais livres $OH^{\bullet}$ e $O_2^{\bullet-}$, responsáveis por danos no DNA, foram estudados em diversos tipos de eletrodos de carbono previamente modificados.

Nitrofural, RNO_2, foi reduzido mono eletronicamente ao seu respectivo nitro ânion radical, $RNO_2^{\bullet-}$, em eletrodo de pasta de carbono modificado superficialmente com um filme de guanina. O nitro ânion radical atacou a guanina imobilizada na superfície do eletrodo e, esta interação *in situ*, resultou na formação de cátions radicais de guanina ($G^{+\bullet}$), que ao interagirem com a guanina (G), foram identificados pelo pico de oxidação em voltametria pulso diferencial, VPD, nas formas diméricas de guanina na região positiva de potencial.

Os outros sistemas estudados se referem ao desenvolvimento de novos eletrodos de carbono modificados ou ainda a utilização procedimentos de modificações desenvolvidas anteriormente, para a detecção de várias moléculas de importância biológica. O ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), xantina (XA) e hipoxantina (HX) foram detectados simultaneamente em eletrodo de grafite pirolítico, previamente modificado em solução de dopamina (EGPD), utilizando VPD. Os picos de oxidação, obtidos por voltametria cíclica foram detectados em 51; 393; 765 e 1080 mV vs Ag / AgCl, $KCl_{(sat)}$ para AA,

AU, XA e HX, respectivamente. O limite de detecção para XA em presença de 5,0 x10^{-5} mol L^{-1} de HX foi 2,3 x10^{-6} mol L^{-1} (com sensibilidade de 2,8 A mol^{-1} L cm^2), enquanto que o limite de detecção para HX na presença de 5,0 x10^{-5} mol L^{-1} de XA foi de 5,6 x10^{-6} mol L^{-1} (com sensibilidade de 1,4 A mol^{-1} L cm^{-2}). XA e HX foram determinadas em amostras de urina e os valores encontrados foram 0,47 μmol L^{-1} e 5,9 μmol L^{-1}, respectivamente.

Serotonina (5-HT) e dopamina (DA) foram determinadas simultaneamente em eletrodo de carbono vítreo, previamente modificado em solução de serotonina (GCE - 5HT). A serotonina foi detectada em 379 mV vs Ag / AgCl, $KCl_{(sat)}$, 31 mV menos positivo daquele observado em eletrodo de carbono vítreo (410 mV), enquanto DA foi detectada a 200 mV. Nenhuma interferência foi observada na presença de (AA), tirosina (Tyr), epinefrina (EP) e noradrenalina (NE).

Finalmente, na última etapa do presente trabalho lignina, extraída a partir de licor de Kraft, foi solubilizada em acetonitrila / H_2SO_4 e a solução resultante utilizada para dispersar nanotubos de carbono de parede múltipla, NTCPM. Esta suspensão foi empregada para modificar a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, posteriormente utilizado na detecção de nitrito por VPD no intervalo de concentração de 4,0 x 10^{-6} ≤ [NO_2^-] ≤ 8, 0 x 10^{-5} mol L^{-1}.

O complexo formado entre neocuproina e Cu (I), um composto em potencial para geração de radicais livres e promoção de lesões no DNA, foi sintetizado e caracterizado.

Palavras-chave: Derivados Purínicos, Neurotransmissores, Radicais Livres, Antioxidantes, Voltametria e Eletrodos de Carbono.

ABSTRACT

Silva, R. P. **" Redox Behavior and Voltammetric Detection of Neurotransmitters, Nitrite, and purine derivatives in Nitrofural Electrochemical Sensors Base Carbon .** 2012. 154p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chemical systems, which are able to produce $OH^{\bullet}$ and $O_2^{\bullet-}$ free radicals, responsible for damage in DNA, were studied at different carbon modified electrode surfaces.

Guanine carbon paste modified electrode was used to promote the nitrofural (RNO_2) monoelectronic reduction to its respective nitro anion radical, $RNO_2^{\bullet-}$, which attacked guanine immobilized on the electrode surface. The interaction *in situ* promoted the formation of guanine cation radicals ($G^{+\bullet}$) between guanine (G), after a dimerization process, were detected in the positive potential range by Differential Pulse Voltammetry, DPV.

The other studied systems refer to development of new carbon modified electrodes or utilization of carbon modified electrodes, previously described, for the detection of several important biological molecules. Ascorbic acid (AA), uric acid (UA), xanthine (XA) and hypoxanthine (HX) were simultaneously detected at pyrolytic graphite electrode, previously modified into dopamine solution **(EGPD),** using DPV. The oxidation peak potentials, were obtained by cyclic voltammetry at 51; 393; 0.765 and 1080 mV *vs* Ag/AgCl, $KC_{l(sat)}$ for AA, UA, XA and HX, respectively. The detection limit for XA in presence of 5.0 $x10^{-5}$ mol L^{-1} HX was 2.3 $x10^{-6}$ mol L^{-1} (with sensibility of 2.8 A mol^{-1} L cm^{-2}), while the detection limit for HX in presence of 5.0 $x10^{-5}$ mol L^{-1} XA was 5.6 $x10^{-6}$ mol L^{-1}

(with sensibility of 1.4 A mol^{-1} L cm^{-2}). XA and HX were determined in urine samples and the values founded were 0.47 μM e 5.9 μM, respectively.

Serotonin (5-HT) and dopamine (DA) were simultaneously detected at glassy carbon electrode, previously modified in serotonin solution **(ECV - 5HT)**. Serotonin was detected at 379 mV *vs* Ag/AgCl, $KC_{l\ (sat)}$, 31 mV less positive potential than that observed at bare glassy carbon electrode (410 mV), while DA was detected at 200 mV. No interference was observed in presence of (AA), tyrosine (Tyr), epinephrine (EP) and noradrenaline (NE).

Finally, in the last stage of this work, lignin, extracted from Kraft liqueur, was solubilized in acetonitrile/H_2SO_4 and used to disperse multi-wall carbon nanotubes, MWNTC**.** This suspension was used to modify the glassy carbon electrode surface and nitrite was detected, by DPV in the concentration range of $4{,}0 \times 10^{-6} \leq [NO_2^-] \leq 8{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}.

The complex formed between neocuproina and Cu (I), a compound which can produce free radicals and thereby cause damage to DNA, was synthesized and characterized.

Keywords: Purine Derivatives, Neurotransmitters, Free Radicals, Antioxidants, Voltammetry and Carbon Electrodes.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS **11**

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL **16**

2.1. Reagentes 16

2.2. Tampões 19

2.3. Soluções 20

2.4. Equipamentos 22

2.5. Eletrodos 24

2.6. Limpeza e ativação de superfícies de eletrodos a base de carbono 24

2.7. Detecção voltamétrica dos analitos 25

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO **26**

3.1. Imobilização de Bases Purínicas do DNA 26

3.1.1. Eletrodos de carbono recobertos por filme de guanina – Formação do filme em diferentes valores de pH. 27

3.2. Imobilização de Guanina ou DNA e suas Interações com o Nitroânion Radical Derivado do Nitrofural 33

3.3.1. Eletrodos de compósitos de pasta de carbono com nitrofural.. 35

3.2.2. Eletrodos de pasta de carbono recobertos por filme de DNA – Concentração e condutividade 47

3.3. Lignina para Modificação de Eletrodos de Carbono 52

3.3.1. Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina Kraft (LK) por ciclagem 52

3.3.2. Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina Kraft pela aplicação de potencial fixo. 55

3.3.3. Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina em presença de tetracloroaurato 59

3.3.4. Eletrodos de carbono vítreo modificados com compósito lignina-nanotubos de carbono. Determinação de íons nitrito. 61

3.4. Eletrodos de Grafite Pirolítico modificados em solução de Dopamina [59] – detecção simultânea de Ácido Ascórbico (AA), Ácido Úrico (AU), Xantina (XA) e Hipoxantina (HX).. 69

3.5. Modificação Superficial de Eletrodos de Carbono Vítreo em Solução de Serotonina por filmes Gerados Eletroquimicamente 90

3.5.1. Modificação do eletrodo de carbono vítreo em solução de serotonina 92

3.6. Modificação Superficial de Eletrodos de Pasta de Carbono em Solução de Quercetina por Filmes Gerados Eletroquimicamente. 97

3.6.1 Modificação de eletrodos em solução de Quercetina 100

3.7. Determinação Analítica de Quercetina com Eletrodos de Carbono não Modificados 105

3.8. Síntese e caracterização do complexo Cobre-neocuproina 107

4. Conclusões 135

5. Referências bibliográficas..... 141

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

De acordo com a biologia celular, o ácido desoxirribonucléico (DNA) é a molécula-alvo da maioria das terapias antineoplásicas e antivirais [1]. O estudo da interação de diversas moléculas com o DNA tem papel fundamental, na identificação de compostos com alto potencial cancerígeno e, a elucidação destes mecanismos de interação pode ser também um dos caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos com ação quimioterápica. Um exemplo típico destes tipos de fármacos são os complexos metálicos, que podem levar à intercalação do metal entre as fitas desta macromolécula, como os compostos de platina [2-3], e levar à quebra da dupla hélice, inibindo o processo de replicação do material genético [4,5].

Neste contexto, as técnicas voltamétricas são ferramentas poderosas para estudar e elucidar esses mecanismos, pelo menos *in vitro* [6], e têm sido muito valiosas principalmente, porque os intermediários e produtos de reação formados na interfase eletrodo/solução são, na maioria das vezes, os mesmos daqueles obtidos via enzimática [7]. Estas técnicas têm ainda grande aplicação analítica devido à rapidez de resposta dos sistemas de detecção, baixo custo e seletividade [8] e podem ser empregadas no estudo e compreensão da interação de diversos compostos com o DNA. A estratégia a ser utilizada depende do tipo de interação, que pode ser, por exemplo, uma intercalação do composto entre duas bases da dupla hélice ou ainda, um dano causado por estresse oxidativo, quando se trata de um composto capaz de oxidar uma das

bases do DNA. Em ambos os casos, ocorre perturbação no mecanismo de transferência de carga através da dupla hélice [9].

A utilização das técnicas voltamétricas em que o eletrodo de trabalho é um eletrodo química ou eletroquimicamente modificado com DNA ou ainda, um biossensor de DNA, abre um leque de possibilidades que vai desde o estudo de interação de diversas moléculas com o DNA imobilizado na superfície do eletrodo, até o desenvolvimento de métodos analíticos envolvendo ou não, esse mecanismo de interação.

Para o desenvolvimento destes eletrodos modificados, diversos tipos de substratos podem ser utilizados entre eles, as superfícies de carbono ou as superfícies metálicas, como o ouro. A imobilização do material biológico, como por exemplo, o DNA, pode ser feita na presença ou ausência de diferentes materiais poliméricos [10-13].

A imobilização desta macromolécula sobre eletrodos sólidos já foi utilizada para construção de dispositivos eletrônicos, sensores e biossensores. Os objetivos foram detectar desordens genéticas decorrentes de lesões causadas ao DNA por radicais livres [12-15], principalmente os radicais derivados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) na presença de metais em seus estados mais baixos de valência [16-18]. Modificações superficiais podem também ser promovidas de modo a preparar Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) para utilização no campo da eletroanálise [19-22] e determinação de atividade antioxidante [16,17].

Revisão detalhada sobre a eletroquímica do DNA, suas implicações e aplicações nos campos biológicos e analíticos pode ser encontrada no trabalho de revisão recentemente publicado por Paleček and Bartošíke [23].

A atividade eletroquímica do DNA está intimamente relacionada à de suas bases purínicas (guanina e adenina) e pirimidínicas (citosina e timina) e, embora as duas primeiras sejam as mais facilmente oxidadas, as demais também o são e, sinais de oxidação distintos para as quatro bases foram obtidos com o auxílio da sonoeletroquímica [24]. Os sinais de corrente dependem do DNA utilizado, sendo maiores em DNA desnaturado, ou seja, simples fita, e sinais menores para dupla hélice.

A fácil oxidação destas bases, guanina e adenina, foi empregada por *Brett et al.* [20], na tentativa de desenvolver um método para quantificação de carboplatina, fármaco utilizado no tratamento contra o câncer, que apresenta pequena atividade eletroquímica e fortes efeitos de adsorção na superfície de eletrodos sólidos. Evidentemente, se a ideia é quantificar um analito via indireta, utilizando o desaparecimento dos picos de oxidação dessas bases na presença da molécula alvo, o sinal obtido na ausência do fármaco deve ser alto e permanecer invariável durante as medições voltamétricas consecutivas; situação que dificilmente é observado experimentalmente.

Brett *et al.* [25] caracterizaram a oxidação das bases purínicas em uma solução contendo DNA dupla hélice (ds-DNA) previamente tratado com ácido perclórico (DNA degradado) e observaram que as correntes de pico de oxidação das bases guanina e adenina aumentavam para registros voltamogramétricos consecutivos a voltamograma. Este trabalho foi o passo

inicial dado na direção do desenvolvimento de um eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com ds-DNA, que permitiu a quantificação de carboplatina nas amostras de soro de pacientes com câncer [20]. As características condutoras da camada modificadora de DNA foram posteriormente comprovadas por estudos de Impedância Eletroquímica [26].

Este eletrodo modificado foi ainda empregado para estudar a interação dos intermediários de redução de nitro compostos com o DNA, já que tanto, o nitroânion radical ($RNO^{\bullet-}$), resultante da redução monoeletrônica do nitrocomposto, quanto o derivado nitroso (RNO) e a hidroxilamina, envolvendo redução com 2 e 4 elétrons, respectivamente, têm *in vivo,* o DNA do Tripanossoma *cruzi* como alvo [27-29].

Para preparação do eletrodo modificado, o eletrodo de carbono vítreo foi recoberto com DNA *calf thymus* (ds-DNA) e, posteriormente modificado em tampão pH 4,5 por aplicação de potenciais altamente positivos (da ordem de +1,4 V) e em seguida modificado em solução de DNA degradado, sob o mesmo potencial aplicado.

A aplicação de potenciais desta ordem aparentemente causou, um distanciamento entre as hélices do ds-DNA imobilizado na superfície do eletrodo e as bases purínicas (G e C) e pirimidínicas (A e T), provenientes da solução de trabalho, foram inseridas entre as hélices e oxidadas na superfície do eletrodo modificado.

O processo de modificação originou uma fase condutora, aplicável no campo da eletroanálise, mas dificultou a interpretação dos resultados de interação com a carboplatina e os nitrocompostos [30].

Deste modo, o caminho mais simples e seguro para identificar qual base é o alvo preferencial de ataque, quer por um fármaco ou por um poluente ambiental, com propriedades carcinogênicas, é imobilizar individualmente cada uma das bases nas superfícies eletródicas de interesse e avaliar a eventual interação isoladamente, postergando a utilização do DNA (matriz de maior complexidade) como alvo biológico, para uma etapa posterior.

O objetivo desta Tese foi avaliar em diversas superfícies de carbono o estudo do comportamento voltamétricos e desenvolvimento de métodos de determinação para derivados purínicos (xantina, hipoxantina, e ácido úrico), neurotransmissores (serotonina e dopamina), ácido ascórbico, nitrito, peróxido de hidrogênio e nitrofural. Os sistemas escolhidos foram aqueles com grande potencialidade para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) como $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, fenoxil e nitro ânion radical, que pudessem interagir, *in situ*, com as bases purínicas e/ou o ácido desoxirribonucleico imobilizados na superfície do transdutor.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

A **Tabela I** apresenta os reagentes empregados e suas respectivas procedências. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, usados sem purificação prévia e as soluções foram preparadas usando solventes apropriados dentre eles água deionizada obtida de um sistema da Barnstead Nanopure.

Tabela I – Reagentes e suas procedências.

Reagentes	Procedência
Acetato de amônio	Merck
Acetato de Sódio	Merck
Acetonitrila	Mallinckrodt
Ácido Acético	Merck
Ácido *L*-ascórbico	Mallinckrodt
Ácido Bórico	Merck
Ácido Cítrico	Merck
Ácido Clorídrico	Merck
Ácido *O*-fosfórico	Merck
Ácido Nítrico	Merck

Tabela I – Reagentes e suas procedências (Continuação)

Reagentes	Procedência
Ácido Sulfúrico	Merck
Ácido Úrico	Aldrich Chemical
Adrenalina	Sigma
Albumina	Sigma
Brometo de cetil butil trimetil amônio	Sigma
Citrato de sódio	Merck
Cloreto de Cobre (I)	Merck
Cloreto de Hexa-amin Rutênio (III)	Merck
Cloreto de Potássio	Merck
Cloridrato de Neocuproína	Sigma
Dihidrogenofosfato Monossódico	Merck
Dimetilformamida (DMF)	QM
Dimetilsulfóxido	QM
DNA *calf thymus*	Sigma
Dopamina	Avocado Res. Chem.
Etanol Absoluto	Merck
Ferricianeto de potássio	Merck
βD-glucose	Sigma
Glutaraldeído	Sigma®
Hidrocloreto de Guanina	Alfa AESAR
Hidrogenofosfato Dissódico	Merck
Hidróxido de Sódio	Merck
Hipoxantina	Merck

Tabela I – Reagentes e suas procedências (Continuação)

Reagentes	Procedência
Lignina	Sigma
Lignina Kraft	Licor Negro
Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas	Lab. Nanomat.– UFMG
Nitrato de Cobre (II)	Merck
Nitrato de Sódio	Merck
Nitrito de Sódio	Merck
Nitrofural	Avocado Res. Chem.
Noradrenalina	Sigma
Óleo Nujol	Aldrich Chemical
8-Oxo-Guanina	Aldrich Chemical
Perclorato de cobre (II)	Merck
Peróxido de Hidrogênio	Merck
PIPES	Avocado Res. Chem.
Pó de Grafite	Merck
Serotonina	Sigma
Sulfato de cobre (II)	Merck
Sulfato de sódio	Merck
Quercetina Dihidratada	Sigma
tetracloroaurato de hidrogênio	Merck
Tirosina	Sigma
Triptofano	Sigma
Xantina	Merck

Todos de grau analíticos e usados sem purificação prévia.

2.2 Tampões [31,32]

Tampão acetato amônio 0,2 mol L^{-1}, pH 7,0 foi preparado por dissolução de massa apropriada de acetato de amônio em água deionizada. O ajuste de pH foi feito com solução de HAc 0,1 mol L^{-1} ou NaOH 2,0 mol L^{-1}.

Tampão acetato de sódio/ácido acético (tampão acetato) 0,1 mol L^{-1} foi preparado por dissolução de massa apropriada de acetato de sódio e adição de volume adequado de ácido acético e posterior dissolução em água deionizada. O ajuste de pH foi feito com solução de HAc 0,1 mol L^{-1} ou NaOH 2,0 mol L^{-1}.

Tampão Britton-Robinson (BR) 0,4 mol L^{-1} foi preparado em diversos valores de pH, pela adição de volumes adequados de soluções estoques de H_3PO_4, H_3CCOOH e H_3BO_3 (todos 0,4 mol L^{-1}). O ajuste de pH feito com solução de NaOH 2,0 mol L^{-1}.

Tampão citrato de sódio/ácido cítrico (T Citrato) 0,1 mol L^{-1} foi preparado em pH 3,0, 4,5 e 7,0 por dissolução de massa apropriada de acetato de sódio e adição de volume adequado de ácido acético em água deionizada. O ajuste do pH foi feito com solução de ácido Citrico 0,1 mol L^{-1} ou NaOH 2,0 mol L^{-1}.

Tampão fosfato (TF) 0,1 mol L^{-1}, foi preparado em pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 por dissolução de massa apropriada dos sais hidrogenofosfato dissódico e dihidrogenofosfato monossódico em água deionizada. O ajuste de pH foi feito com solução de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} ou NaOH 2,0 mol L^{-1}.

Tampão PIPES foi preparado na concentração de 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0 por dissolução de massa apropriada de PIPES em NaOH 1,0 mol L^{-1} com posterior ajuste de pH feito também com solução de NaOH 1,0 mol L^{-1}. O PIPES por se tratar de um eletrólito necessitou de ajuste de força iônica para 0,3 mol L^{-1} com $NaNO_3$.

2.3 Soluções

Soluções estoques de ácido ascórbico 1,0 x 10^{-1} mol L^{-1}, dopamina 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}, glicose e serotonina 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} foram preparadas por dissolução de massa apropriada de cada analito em solução tampão TF, pH 6,5. A solução de glicose foi mantida em temperatura ambiente por 24 h para permitir o equilíbrio das formas anoméricas.

Soluções estoques de peróxido de hidrogênio 5,0 x 10^{-2} mol L^{-1} foram preparadas, por diluição de volume apropriado desta substância em solução de tampão fosfato, pH 6,5 e posteriormente mantidas sob abrigo de luz.

Soluções estoques de guanina e 8-oxo-guanina foram preparadas na concentração de 5,0 x 10^{-2} mol L^{-1} pela dissolução dos respectivos sais em solução de NaOH 1,0 mol L^{-1}.

Soluções estoques de ácido úrico, xantina e hipoxantina foram preparadas na concentração de 5,0 x 10^{-2} mol L^{-1} por dissolução de massa apropriada dos compostos em 2,0 mL de NaOH 1,0 x 10^{-1} mol L^{-1}, com posterior diluição a 10,0 mL com TF pH 6,5.

Solução de albumina 0,1%: a solução foi preparada pela dissolução de 0,1 g de albumina em 100 mL de solução tampão BR de pH 8,0.

Soluções de brometo de cetil-butil-trimetil amônio (CTBA) 0,1%, glutaraldeído 2,5%, cloridrato de neocuproína 2,0 x 10^{-3} e 0,1 mol L^{-1}, e sulfato de sódio 0,1 mol L^{-1} foram preparadas por dissolução de massa apropriada dos compostos em volume adequado de água deionizada.

Soluções de ferricianeto de potássio 5,0 x 10^{-2} mol L^{-1} e cloreto de hexa-aminrutênio (III) 5,0 x 10^{-2} mol L^{-1} foram preparadas em água deionizada ou em solução tampão com pH e composições adequadas.

Solução de DNA dupla hélice 80,0 mg L^{-1} foi preparada dissolvendo-se 2,0 mg de DNA *Calf thymus* em solução tampão ácido acético/acetato de sódio e o volume completado a 25,0 mL com este mesmo tampão.

A suspensão de *NTC* foi preparada seguindo procedimento de Milczarek [33], com modificações que serão discutidas em momento oportuno.

Lignina *kraft* (1,0 g L^{-1}), extraída de licor negro por precipitação com ácido sulfúrico, foi homogeneamente solubilizada usando acetonitrila:ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} (1:1, v/v) como solvente [34].

Soluções estoques de nitrofural 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} foram preparadas, por dissolução de quantidade apropriada do fármaco em água/etanol (v/v 1:1) e mantidas sob o abrigo de luz.

Soluções de nitrato de cobre (II), sulfato de cobre (I), e perclorato de cobre (II), 2,0 x 10^{-3} e 1,0 mol L^{-1} também foram preparadas em água deionizada ou em solução tampão, com pH e composições adequadas.

Para os ensaios realizados por espectrometria de absorção atômica foram preparadas soluções de nitrato de cobre (2,0 a 12,0 mg L^{-1}), cloridrato de

neocuproína 1,2 g L^{-1} e do sal complexo de cobre-neocuproína em solução de acetonitrina 4% (v/v) em H_2O.

A solução estoque de quercetina 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1} foi preparada por dissolução de massa apropriada desta substância em volume adequado de etanol absoluto.

Soluções de lignina 1,0 x g L^{-1}, padrão ou kraft foram preparadas em água / DMF (1:1, v/v).

Soluções de tetracloroaurato de hidrogênio, 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em ácido nítrico 0,1 mol L^{-1}, também foram preparadas por diluição em solução tampão com pH e composições adequadas.

Para obtenção dos dados voltamétricos volumes adequados das soluções estoques foram adicionados à célula eletroquímica contendo o tampão de pH adequado, de modo a obter as concentrações desejadas na célula eletroquímica.

As soluções foram estocadas sob refrigeração e ao abrigo de luz e usadas no máximo três dias após o seu preparo.

2.4 Equipamentos

As medidas de pH foram efetuadas com o pH-metro modelo 654 acoplado a um eletrodo de vidro modelo 6.0203.100 (OE), ambos da Metrohm.

As medidas voltamétricas foram efetuadas utilizando Potenciostato/Galvanostato PG STAT20 da Eco-Chemie acoplado ao software GPES versão 4.9005β.

As medidas de absorção atômica para as determinações de Cobre foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite GTA 110 (Varian, modelo Spectra A 220), equipado com corretor de fundo Zeeman e amostrador automático. O sistema de aquisição de dados foi gerenciado por microcomputador em ambiente Windows e, como fonte de radiação, foi empregada lâmpada de cátodo oco de Cu, operando em 7 mA e comprimento de onda 327,4 nm, com abertura de fenda de 0,5 nm.

As medidas termogravimétricas (TG) foram realizadas em um aparelho SHIMATZU, a uma taxa de aquecimento constante de 10 ºC min^{-1} sob fluxo constante de ar de 50 cm^3 min^{-1}, até temperatura de 900 ºC.

As medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um aparelho SHIMADZU, a uma taxa de aquecimento constante de 10 ºC min^{-1} sob um fluxo constante de nitrogênio de 100 cm^3 min^{-1}, até temperatura de 600 ºC.

Análise elementar e espectro de infravermelho foram realizados nas amostras de solução de neocuproína 0,1 mol L^{-1}, de nitrato de Cobre (II) 0,1 mol L^{-1} e do precipitado formado pela mistura das soluções de cobre e neocuproína. Estes ensaios foram realizados na Central Analítica IQUSP-SP.

2.5 Eletrodos

Utilizou-se um sistema constituído por três eletrodos: *Ag/AgCl,KCl*$_{(Sat)}$. (referência), espiral de platina (auxiliar) e como eletrodos de trabalho: grafite pirolítico de grau espectroscópico (∅ = 5,0 mm), carbono vítreo (∅ = 3,0 mm), pasta de carbono (∅ = 4,0 mm) e eletrodo de diamante altamente dopado com boro (∅ = 3,0 mm).

Os eletrodos de pasta de carbono foram preparados pela mistura de grafite/nujol na proporção de 2:1 (m:m). A limpeza dos demais eletrodos foi realizada pelo polimento em feltro metalográfico com alumina (1,0 e 0,3 μm), seguida de lavagem com água deionizada e manutenção em banho de ultrassom por três minutos.

2.6 Limpeza e ativação de superfícies de eletrodos a base de carbono

Com exceção dos eletrodos de pasta de carbono, a limpeza dos demais eletrodos será descrita na parte dos resultados e, foi sempre seguida de uma etapa de limpeza eletroquímica por aplicação de +1,5 V por 120 s ao eletrodo de trabalho, previamente imerso com os eletrodos de referência e auxiliar em solução de NaOH 1,0 x 10^{-1} mol L^{-1}, sob agitação. Em seguida, registraram-se três voltamogramas cíclicos consecutivos nas seguintes condições:

$E_{inicial}$: -0,2 V, $E_{\lambda..}$: +1,5 V, E_{final}: -0,2 V, ν = 100 mV s^{-1}, com o sistema sendo mantido sob agitação para auxiliar o processo de limpeza.

2.7 Detecção voltamétrica dos analitos

Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos até a estabilização da linha de base, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, no pH adequado usando pré-concentração de 10 s a +1,5V no intervalo de +0,5 V a +0,8 V para XA , +0,8 V a +1,3 V para HX e, para quercetina, pré-concentração de 10 s a -0,3 V no intervalo de -0,3 V a +0,3V, todos com as mesmas velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}, amplitude de pulso de 50 mV e duração de pulso de 70 ms. Para a obtenção das curvas analíticas de XA e HX, variaram-se as concentrações, registrando-se os voltamogramas nas mesmas condições experimentais acima descritas, realizando-se três voltamogramas consecutivos para cada valor nominal de concentração.

A detecção simultânea de 5-HT e DA com 2,0 x 10^{-6} mol L^{-1} foi efetuada em solução TF, pH 2,0 – 10,0. Os VPD foram obtidos no branco usando pré-concentração a +1,5 V por 20 s, ν = 10 mV s^{-1}; amplitude de pulso de 50 mV; duração de pulso de 70 ms, intervalo de -0,2 V à 0,7 V. Para obtenção das curvas analíticas variaram-se as concentrações dos analitos de interesse, em TF, pH 6,5, nas mesmas condições experimentais acima descritas. Três voltamogramas consecutivos foram obtidos para cada valor nominal de concentração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Imobilização de Bases Purínicas do DNA

Em 2003, Silva e Serrano [35] descreveram a modificação da superfície de eletrodos de pasta de carbono em solução de Guanina. Um filme polimérico condutor foi obtido na superfície do eletrodo com a imobilização de dímeros desta base. O processo envolveu a imersão de um eletrodo de pasta de carbono em solução de Guanina com aplicação de potenciais elevados (+1,1 V), potencial este suficiente para oxidação desta base. Quando o eletrodo foi modificado de maneira similar, mas com a aplicação de potenciais inferiores a oxidação de guanina (+0,4 V), também foi obtido um filme polimérico, porém pouco condutor. Em ambos os casos, a guanina imobilizada nos filmes, difere da maneira como ela é encontrada no DNA. Por sua vez, Tuñón-Blanco *et al.* [36], imobilizaram esta base em eletrodo de grafite pirolítico em potencial de circuito aberto por 30 s e, após a realização de 10 voltamogramas cíclicos entre -0,2 e 1,4 V, o filme formado pelos produtos de oxidação da base demonstrou efeito catalítico para oxidação de NADH.

Neste trabalho, para evitar a polimerização da Guanina gerada eletroquimicamente imobilizou-se, mecanicamente, esta purina sobre eletrodos de pasta de carbono (EPC), carbono vítreo (ECV) e grafite pirolítico (EGP), buscando obter filmes poliméricos em que a estrutura da base não fosse alterada em relação à base presente no DNA.

3.1.1. Eletrodos de carbono recobertos por filme de guanina – Formação do filme em diferentes valores de pH.

Eletrodos de carbono vítreo, diamante dopado com boro, grafite pirolítico e pasta de carbono foram recobertos com solução de guanina, preparada em tampão com composições e valores de pH variados. A modificação de eletrodos de carbono vítreo consistiu do recobrimento superficial com 25,0 μl de solução de guanina 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1}, preparada em NaOH 0,1 mol L^{-1} seguida da adição de 50,0 μl de solução tampão fosfato (TF) 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0, e secagem a temperatura ambiente por uma noite.

Eletrodos de pasta de carbono e grafite pirolítico foram recobertos com 25,0 μl de solução de guanina 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1}. Em seguida foi feita a adição de 50,0 μl de tampão acetato 0,2 mol L^{-1}, pH 7,0 e posterior secagem em temperatura ambiente por uma noite. O mesmo procedimento foi repetido substituindo-se o tampão acetato por tampão citrato 0,1 mol L^{-1}, tampão fosfato (TF) 0,1 mol L^{-1}, tampão PIPES 0,1 mol L^{-1} e tampão Britton-Robinson (BR) 0,2 mol L^{-1}, todos com pH 7,0.

Eletrodos de pasta de carbono foram superficialmente recobertos com 25 μl de solução de Guanina 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1} e em seguida, volumes de 20,0; 25,0; 32,5; 35,0 e 45,0 μl de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} foram adicionados. Como anteriormente, os eletrodos secaram a temperatura ambiente por uma noite. Deste modo, filmes de guanina foram formados nos seguintes valores de pH: 7,2; 6,0; 5,0; 3,5 e 2,5. Tal metodologia foi adotada a fim de controlar a quantidade de Guanina adicionada à superfície de cada um dos eletrodos, já que nestes valores de pH esta base é pouco solúvel. Os

valores de pH foram estimados utilizando volumes suficientes para realização de medidas com pHmetro, mantendo-se as respectivas proporções de ácidos e bases para cada valor de pH.

Para superfícies de carbono mais lisas como eletrodos de carbono vítreo e eletrodos de diamante dopado com boro, não ocorreu a formação dos filmes. Após secagem restou apenas um sólido branco que se desprendia facilmente das superfícies, de modo que estas foram descartadas. A formação de filme ocorreu apenas em eletrodos de grafite pirolítico e pasta de carbono.

Para verificar a influência da constituição de tampão, eletrodos de pasta de carbono e grafite pirolítico foram recobertos com o mesmo volume de solução de guanina e em seguida foram adicionados 50,0 µL dos seguintes tampões, todos em pH 7,0: tampão acetato de amônio, tampão citrato, tampão fosfato (TF), tampão PIPES, tampão Britton-Robinson (BR). Apenas os filmes formados com os tampões TF e BR apresentaram visivelmente aparência polimérica e esbranquiçada em EPC e EGP, porém os filmes formados sobre a superfície de grafite pirolítico se desprenderam rapidamente ao serem colocados em solução. Assim as melhores condições para formação mecânica de filme de guanina foram obtidas com eletrodos de Pasta de Carbono.

Eletrodos de pasta de carbono modificados nestas condições foram nomeados por EPC-G pH 2,5; EPC-G pH 3,5; EPC-G pH 5,0; EPC-G pH 6,0 e EPC-G pH 7,2. Com estes eletrodos foram obtidos voltamogramas cíclicos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,5 e após a estabilização da linha base, volume adequado de ferricianeto de potássio foi adicionado à célula eletroquímica de modo a obter concentração final de 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Os

voltamogramas obtidos com estes eletrodos foram comparados com eletrodos de pasta de carbono sem modificação (**EPC**). Com isto, acompanhou-se o desempenho da modificação superficial do eletrodo em termos de corrente, potencial de oxi-redução, resistência, mecânica e componente capacitiva do filme em diferentes valores de pH. A **figura 01** apresenta o quinto voltamograma de cada série obtido com **EPC-G** e **EPC** em diferentes valores de pH.

Observando-se os voltamogramas obtidos em solução de tampão fosfato pH 6,5, linha tracejada das **figuras 1A-1E**, verifica-se que há um aumento da corrente de fundo para todos os **EPC-G** em relação ao **EPC**, indicando um aumento de corrente capacitiva, diminuição nos níveis de corrente e variação nos potenciais tanto de oxidação quanto de redução.

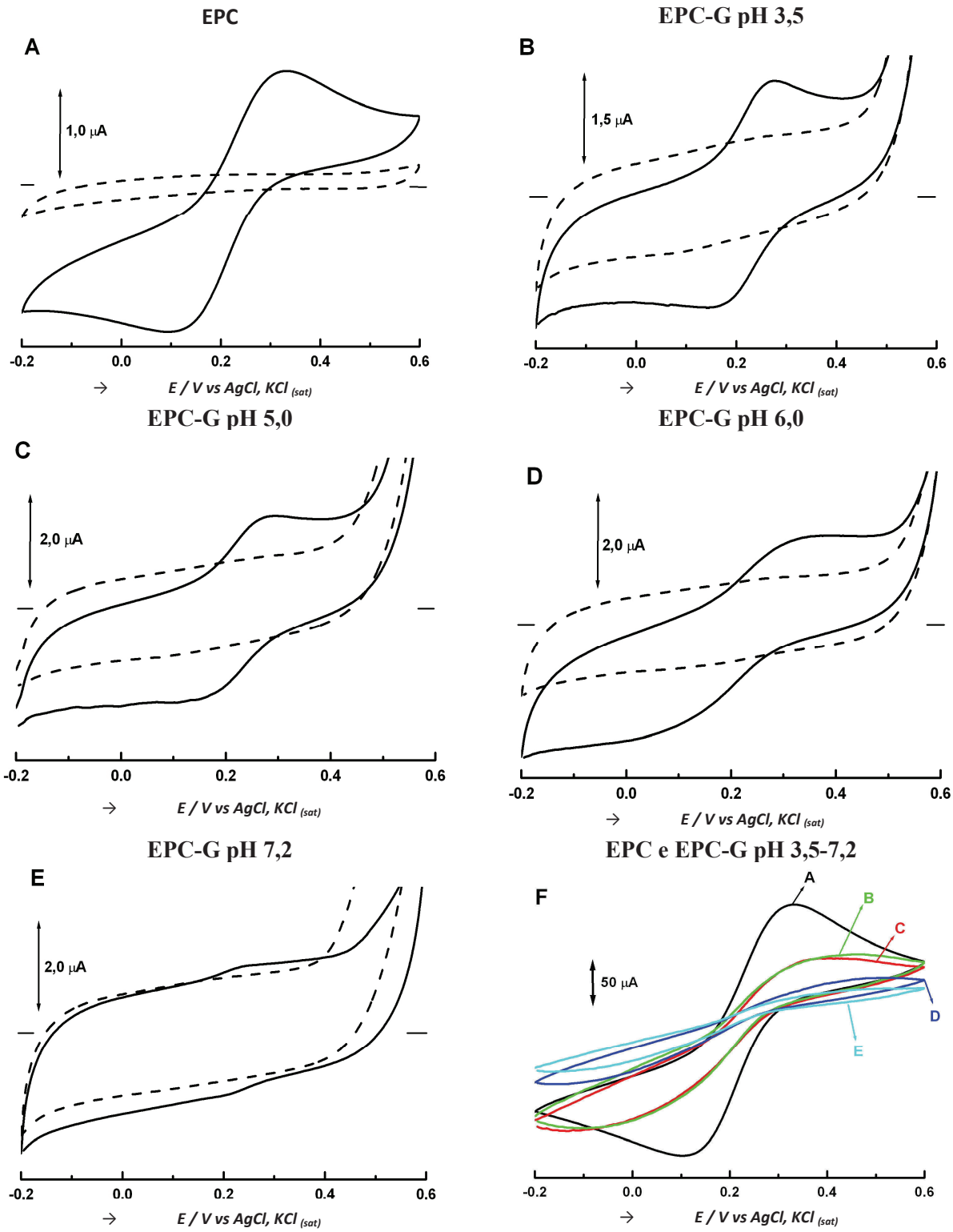


Figura 01. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de Ferricianeto de Potássio 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em TF 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5, (linha sólida) e seu respectivo branco (linha segmentada). **A)** eletrodo limpo **EPC, B-E) EPC-G** com filme formado no pH indicado na figura. **F)** Voltamogramas de **A-E,** sobrepostos após subtração dos brancos. Condições experimentais: E_i = - 0,2 V; E_λ = 0,6 V; E_f = - 0,2 V e v = 100 mVs^{-1}.

A **figura 02A** apresenta os valores de potencial de oxidação obtidos a partir dos voltamogramas apresentados na **Figura 01**. Pode-se observar que os potenciais de oxidação (Epa), obtidos com o **EPC** e o **EPC-G (pH 6,0)** foram similares, aproximadamente + 310 mV, para **EPC-G (pH 3,5 e 5,0)** houve uma ligeira antecipação (± 40 mV)**;** já para o eletrodo **EPC-G (pH 7,2)** a antecipação foi superior a 70 mV. Comportamento semelhante foi obtido no processo catódico, onde o potencial de redução foi facilitado em 54 mV, 29 mV e 87 mV, respectivamente para os eletrodos **EPC-G (pH 3,5, 5,0 e 7,2).** O potencial de redução foi dificultado em 35 mV para **EPC-G pH 6,0.**

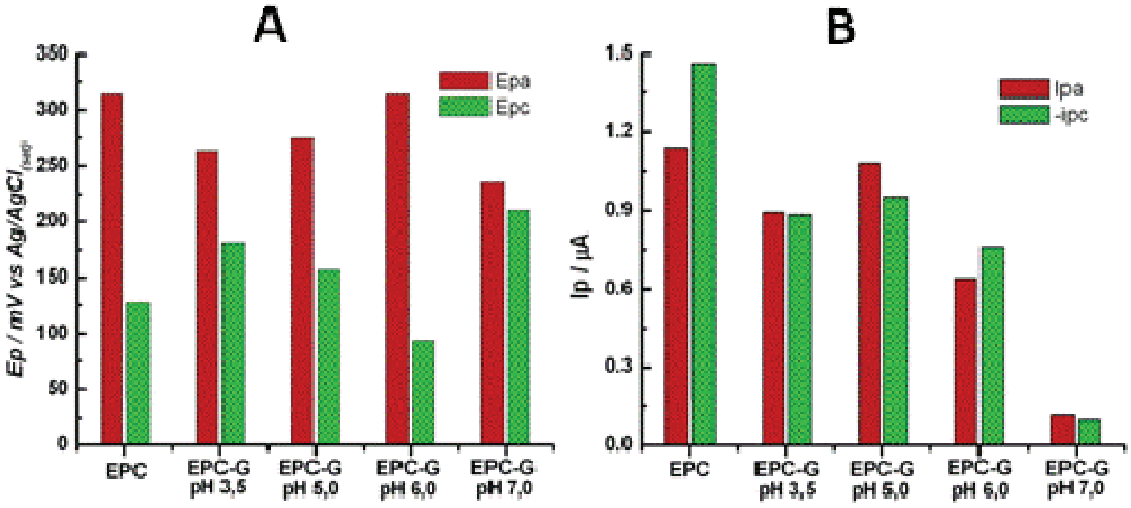


Figura 02. A) Valores de potenciais de pico anódico (Epa) e catódico (Epa) e B) Valores de correntes de pico anódico (Ipa) e catódico (Ipc), obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos apresentados na **Figura 01**.

A **figura 02B** apresenta os valores de corrente de pico de oxidação (Ipa) e de redução (Ipc) obtidos a partir dos voltamogramas apresentados na **Figura 01**. Observa-se que para todos os eletrodos recobertos com guanina houve

diminuição nos níveis de corrente em relação àqueles obtidos com **EPC**, porém com os eletrodos **EPC-G 5,0,** a queda foi menos pronunciada, com diminuição de 5,3% para Ipa e de 35% para Ipc; para eletrodos do tipo **EPC-G pH 3,5** a diminuição nos níveis de corrente foi de 22% para Ipa e de 40% para Ipc; Para eletrodos do tipo **EPC-G pH 6,0**, houve diminuição de 56% para Ipa e de 52% para Ipc; porém a resposta a ferricianeto para eletrodos do tipo **EPC-G pH 7,2** praticamente foi bloqueada, tanto no sentido anódico como no catódico**.**

Com base nos valores de correntes de pico e nos valores de potenciais de picos obtidos em solução de ferricianeto de potássio, as melhores condições para a formação de filmes de guanina foram em pH 5,0 e 3,5. A **Figura 01F**, apresenta os voltamogramas obtidos em **Figura 1A-1E**, subtraídos dos seus respectivos brancos, com a intenção de eliminar os efeitos de corrente de fundo e assim comparar os voltamogramas obtidos com cada eletrodo. A sobreposição também indica que os voltamogramas que apresentaram resultados mais próximos ao **EPC** foram os **EPC-G** que foram formados em pHs 3,5 e 5,0.

3.2 Imobilização de Guanina ou DNA e suas interações com o nitroânion radical derivado do Nitrofural

Os nitrofuranos, **Figura 03,** pertencem a uma classe de fármacos usada como agentes antibióticos e antimicrobianos. A ação farmacológica se deve a presença de um grupo nitro ligado à cadeia lateral de um furano. Esses compostos apresentam mecanismos de ação citotóxica que, inicialmente, envolvem uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas por inibições de várias enzimas que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita [28,37-40].

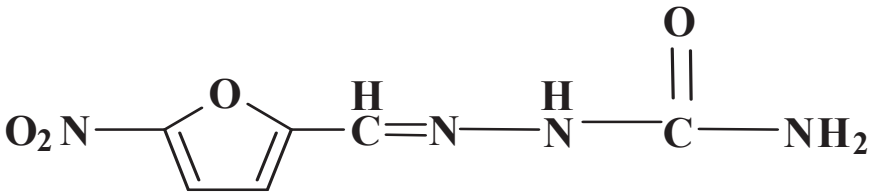


Figura 03 - Estrutura Química do Nitrofural RNO_2

Em geral, o primeiro passo do metabolismo desses compostos é a sua redução ao correspondente nitro ânion radical. Sob condições anaeróbias, esse radical pode sofrer redução, gerando derivado nitroso, hidroxilamina ou o respectivo aminoderivado [41]. O nitroradical aniônico e o derivado hidroxilamínico são os principais intermediários responsáveis pela ação citotóxica dos nitroheterocíclicos [20, 42]. Já em condições aeróbicas, o nitro ânion radical reage com o oxigênio para formar o ânion superóxido, que é transformado em peróxido de hidrogênio pela ação enzimática da superóxido dismutase. Se ocorrer o acúmulo de peróxido de hidrogênio na célula do parasita, isto poderá gerar radicais $OH^{\bullet}$, espécie altamente oxidante,

responsável pelo estresse oxidativo das células e danos nas moléculas de DNA do parasita e, geralmente, em que os sítios de ataque são as bases purínicas [20,37].

Os dados obtidos por Julião *et al.* [42] com eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) permitiram propor o seguinte mecanismo para descrever o comportamento eletroquímico do nitrofural (RNO_2) em tampão Britton-Robinson (BR) usando voltametria cíclica. O RNO_2 foi reduzido diretamente a amina derivada (RNH_2) em um processo envolvendo seis elétrons e seis prótons (pH entre 2,0-4,0), **Esquema 1**. Na faixa de pH entre 7,0-12, em meio predominantemente aquoso, o processo de redução se deu em duas etapas de redução: de RNO_2 para $RNO_2^{\bullet-}$ (1 elétron) e seguido pela redução desse radical para hidroxilamina derivada RNHOH (3 elétrons).

$$E_{pc,1a} \quad R\text{–}NO_2 + 6e^- + 6H^+ \longrightarrow R\text{–}NH_2 + 2H_2O \qquad (2{,}0 \leq pH \leq 4{,}0)$$

$$E_{pc,RL} \quad R\text{–}NO_2 + e^- \rightleftharpoons R\text{–}NO_2^{\bullet-} \qquad (7{,}0 \leq pH \leq 12)$$

$$E_{pc,2a} \quad R\text{–}NO_2^{\bullet-} + 3e^- + 4H^+ \longrightarrow R\text{–}NHOH + H_2O \qquad (7{,}0 \leq pH \leq 12)$$

Esquema 01 – Mecanismo de redução do Nitrofural RNO_2 [42]

3.2.1 Eletrodos compósitos de pasta de carbono com nitrofural

Para construção dos compósitos de grafite e Nitrofural, este último foi misturado ao grafite nas seguintes concentrações em massa: 3,3%, 6,7% e 13,3%. A esta mistura foi adicionado o agente aglutinante na proporção de 2:1 (m:m), mistura/nujol. Os compósitos de pasta de carbono com Nitrofural receberam as seguintes denominações, **EPC-RNO_2**, seguido respectivamente da porcentagem do Nitrofural, **EPC-RNO_2-3,3%, EPC-RNO_2-6,7%** e **EPC-RNO_2-13%.**

Eletrodos do tipo **EPC-RNO_2** foram superficialmente recobertos com 25 μl de solução de Guanina 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1} e em seguida foram adicionados 32,5 μl de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1}, pH 5,0. Como anteriormente, os eletrodos secaram a temperatura ambiente por uma noite. Deste modo, o filme de Guanina foi formado em pH 5,0. Eletrodos assim modificados foram denominados **EPC-RNO_2-G.**

Eletrodos de pasta de carbono foram utilizados em solução de Nitrofural (RNO_2) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0, porém não foi possível estabilizar o ânion nitro radical $RNO_2^{\bullet-}$, ou seja observar o pico de redução, em solução desaerada, ocorrendo a redução direta a hidroxilamina [28], diferentemente do que foi obtido por Julião *et al..* [43], que observaram a formação do nitro radical em pH 8,0, utilizando eletrodo de diamante altamente dopado com boro. Com o objetivo de obter a formação do nitro ânion radical e avaliar sua interação com a guanina utilizou-se os eletrodos compósitos **EPC-RNO_2-3,3%, EPC-RNO_2-6,7%** e **EPC-RNO_2-13%.**

A **Figura 04** apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR, pH 8,0, com eletrodo EPC linha pontilhada, indicada na figura por A. Como esperado, não foram observados nenhum pico de redução ou oxidação. O voltamograma utilizando EPC-RNO_2, curva B (linha tracejada), apresentou um pico de redução em -0,55 V (Epc1), atribuído a formação do radical aniônico $RNO_2^{\bullet-}$, seguido pela formação de hidroxilamina derivada (RNHOH) e no sentido anódico, observou-se um primeiro pico de oxidação em - 0,43 V (Epa1), atribuído a oxidação do $RNO_2^{\bullet-}$ a RNO_2, e um segundo pico de oxidação (Epa2) em + 0,12 V, atribuído a oxidação da hidroxilamina ou oxidação do derivado nitroso (RNO). Com eletrodo EPC-RNO_2–G, representado por C, linha sólida, não se observou o pico de redução característico de formação do nitro ânion radical, ocorrendo a redução diretamente a RNHOH, fato que poderia ser atribuído a interação do radical aniônico com a guanina do filme, haja vista que no sentido anódico observou-se apenas um pico de oxidação em + 0,23 V. Este último, poderia ser atribuído tanto a um produto de interação $RNO_2^{\bullet-}$-G, quanto ao deslocamento do pico de oxidação da hidroxilamina ao derivado nitroso, deslocado para valores mais positivos, pela barreira imposta pela presença de guanina na composição do eletrodo.

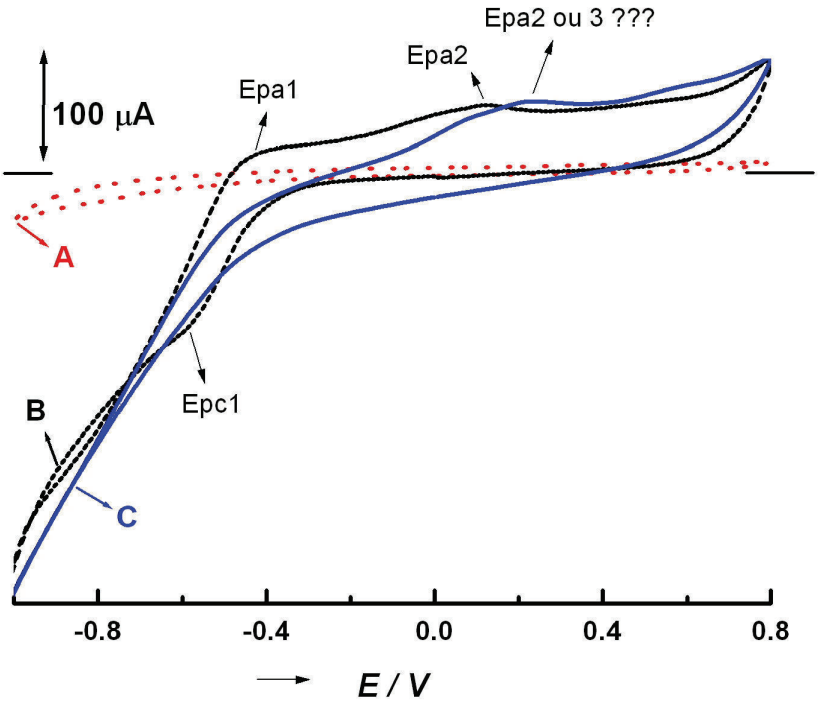


Figura 04. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0 **A)** eletrodo **EPC** e linha pontilhada **(·····), B)** eletrodo compósito de Nitrofural **EPC-RNO$_2$,** linha segmentada **(----)** e **C)** eletrodo compósito de Nitrofural recoberto com guanina, **EPC-RNO$_2$-G,** linha sólida **(—).** Condições Experimentais: E_i = 0,0 V; $E_{\lambda 1}$ = -1,0 V; $E_{\lambda 2}$ = 0,8 V E_f = 0,0 V e ν = 100 mVs^{-1}.

Buscando gerar uma maior quantidade de radicais que eventualmente pudessem interagir com a guanina imobilizada em eletrodos do tipo EPC-RNO$_2$, aplicou-se pré-concentração a – 0,55 V, restringindo-se a janela de potencial de varredura (- 0,25 V à – 0,75 V) de modo a evitar o desproporcionamento do radical. A **figura 05** apresenta estes voltamogramas. Os voltamogramas **A** e **B** foram obtidos respectivamente com eletrodos do tipo EPC e EPC-RNO$_2$, ambos sem condicionamento, enquanto os voltamogramas **C** e **D** foram obtidos após pré-condicionamento de 30 e 60 s a - 0,55 V. Nos casos **A** e **B** não foi possível obter picos bem definidos de formação do nitro-radical, observando-se apenas um “ombro” na região de formação do mesmo,

mas, após o pré-condicionamento foi possível identificar um ombro, indicativo da redução monoeletrônica do nitrofural, com formação do radical $RNO_2^{\bullet-}$ (curvas **C** e **D**), indicativo de que houve melhora no processo estabilização deste radical com o pré-condicionamento, fato não observado com os eletrodos sem condicionamento (voltamograma B da **figura 05**).

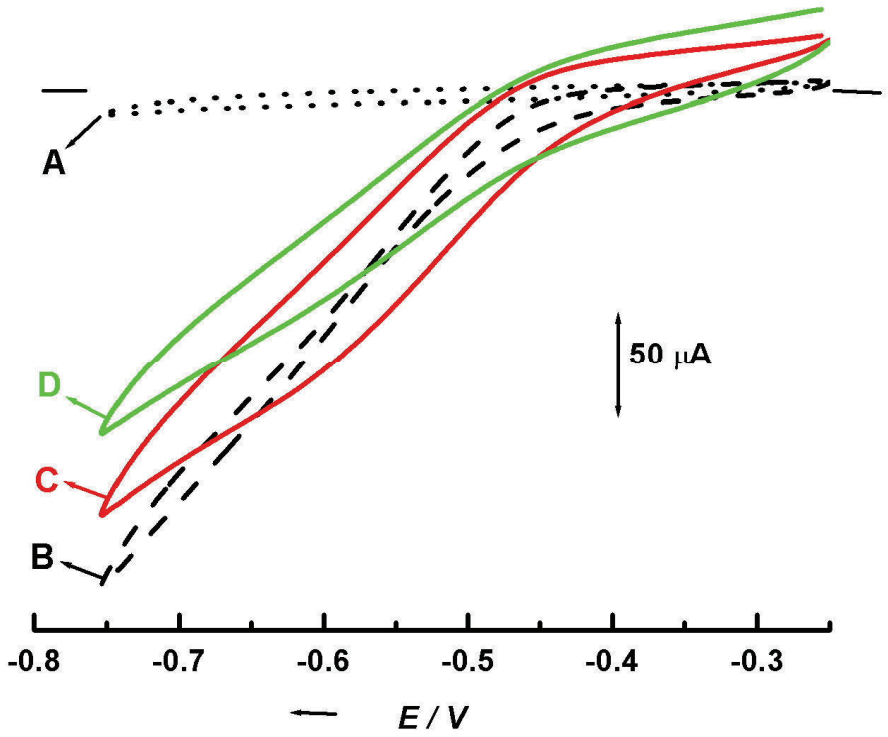


Figura 05. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0: **A)** eletrodo limpo **EPC** e linha pontilhada **(·····),** sem pré-condicionamento, **B) EPC-RNO_2,** linha segmentada **(----),** sem pré-condicionamento., **C) EPC-RNO_2,** linha sólida **(—),** 30 s de pré-condicionamento a -0,55 V **D) EPC-RNO_2,** linha sólida **(—),** 60 s de pré-condicionamento a -0,55 V Condições Experimentais: E_i = - 0,25 V; E_λ = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V e v = 100 mVs^{-1}.

Devido à baixa sensibilidade da voltametria cíclica, optou-se por utilizar a voltametria de pulso diferencial aplicando um pré-condicionamento prévio, para

melhor visualização do pico de oxidação do $RNO_2^{\bullet-}$ formando RNO_2. A **Figura 06** apresenta os voltamogramas de pulso diferencial em solução de tampão BR, pH 8,0. Nos três voltamogramas foi possível detectar o pico de oxidação do radical $RNO_2^{\bullet-}$.

O voltamograma indicado por **A** na **figura 06** foi realizado com eletrodos EPC-RNO_2 sem pré-condicionamento. O mesmo procedimento foi adotado no voltamograma **B,** utilizando o eletrodo recoberto com guanina (EPC-RNO_2-G). Observou-se uma ligeira diminuição de pico de oxidação, que se especulou ser uma interação da guanina presente no filme com nitro-radical gerado eletroquimicamente.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de nitro-radical gerado, aplicou-se neste eletrodo um potencial de pré-condicionamento de -0,65 V por 60 s efetuando-se a varredura em sentido positivo de potencial. O voltamograma obtido, **figura 6C** mostra uma grande queda de corrente no pico de re-oxidação do $RNO_2^{\bullet-}$ no eletrodo EPC-RNO_2-G, indicando que o nitro-radical foi consumido pela guanina imobilizada na superfície do eletrodo. Cabe salientar, que o potencial de -0,65 V foi escolhido, pois o pré-condicionamento em potenciais mais negativos poderia haver a formação direta de hidroxilamina e não a nitro radical aniônico.

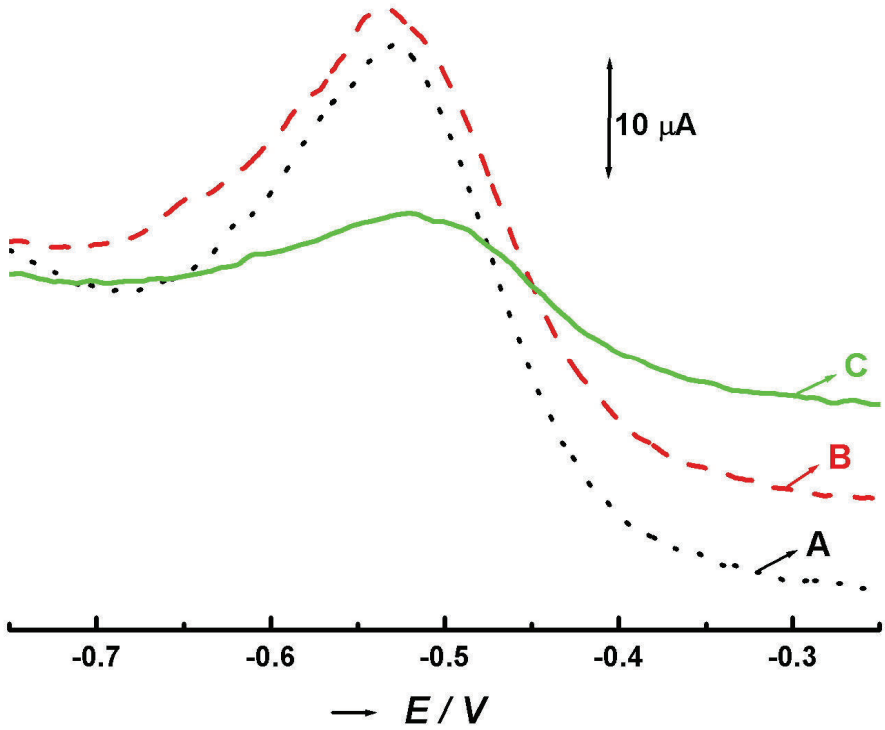


Figura 06. VPD obtidos em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0 **A) EPC-RNO_2** e linha pontilhada **(.....),** sem pré-condicionamento., **B) EPC-RNO_2-G,** linha segmentada **(----),** sem pré-condicionamento., **C) EPC-RNO_2-G,** linha sólida **(—),** 60 s de pré-condicionamento. a -0,65 V Condições experimentais: E_i = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V, v = 10 mVs^{-1} amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms.

A fim de verificar se era possível identificar algum produto da possível interação entre o nitroradical e a guanina, VPD foram obtidos com um novo EPC-RNO_2-G, aplicando-se o mesmo pré-condicionamento, porém estendendo-se o potencial final até 0,6 V. A **figura 07** apresenta o voltamograma, representado pela linha segmentada, onde se observou um primeiro pico de oxidação a – 0,53 V (Ep1), proveniente da re-oxidação do nitro-radical, um segundo pico a + 0,07 V (Ep2), proveniente da oxidação da hidroxilamina e ainda um terceiro pico mal definido em + 0,41 V, possivelmente da oxidação de 8-oxo-guanina, produto primário da oxidação da guanina. Como a guanina é oxidada eletroquimicamente em potenciais superiores a + 0,7 V, a

8-oxo-guanina poderia ser formada apenas pela interação entre guanina e o nitroradical aniônico. Assim obteve-se o mesmo voltamograma em solução de guanina 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, nas mesmas condições anteriores, (linha sólida) para verificar se era possível obter um sinal maior de oxidação de 8-oxo-Guanina. No entanto, não houve alteração no perfil do voltamograma, apenas uma nova diminuição no pico de oxidação do nitro-radical foi detectada.

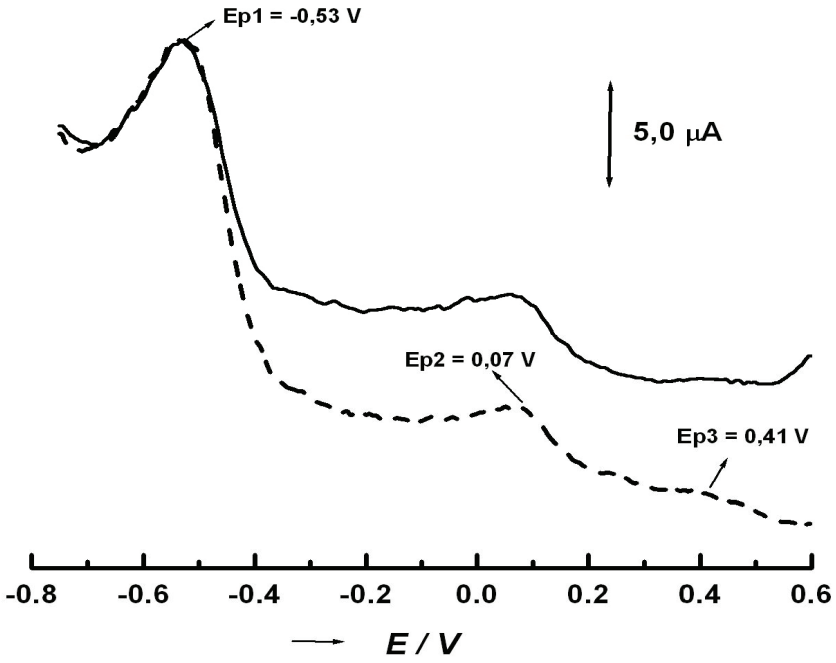


Figura 07. VPD obtidos com **EPC-RNO$_2$-G** em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0 linha pontilhada (**.....**), 60 s de pré-condicionamento a -0,65 V; linha sólida (**—**) idem anterior mais solução de guanina 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, Condições experimentais: E_i = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V, v = 10 mVs^{-1} ampl. de de pulso = 50 mV; larg. de pulso = 70 ms.

A **Figura 08** apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR, pH 8,0, com eletrodos EPC-RNO$_2$ apresentando diferentes concentrações de Nitrofural no compósito, todos com pré-condicionamento de -0,55 V por 60 s. O voltamograma **A**, desta figura, foi registrado com eletrodo

sem modificação (EPC), o voltamograma **B** foi realizado com EPC-RNO_2, com compósito contendo 3,33% de nitrofural, o voltamograma **C** foi realizado com EPC-RNO_2, contendo 6,66% de nitrofural, e **D** com 13,3% de nitrofural no compósito. Pode-se observar que com o aumento da concentração de nitrofural no compósito houve um aumento nos níveis de corrente, bem como uma maior definição do par redox $RNO_2/RNO_2^{\bullet-}$, voltamograma **D** da **figura 08**. Assim o compósito EPC-RNO2 13,3%, foi utilizado para verificar se com o aumento da concentração de RNO_2 seria possível a detecção da interação entre guanina e o nitroradical gerado eletroquimicamente, pelo pré-condicionamento a -0,65 V por 60 s.

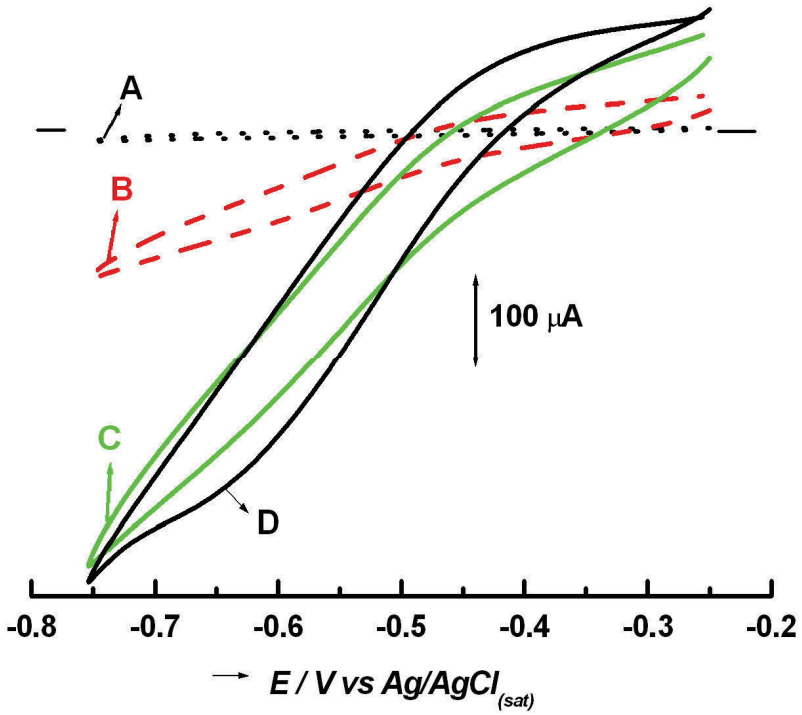


Figura 08. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0, com 60 s de pré-condicionamento a -0,65 V **A)** eletrodo limpo **EPC** e linha pontilhada (·····), **B) EPC-RNO_2 3,33%,** linha segmentada (----), **C) EPC-RNO_2 6,66%,** linha sólida (—), **D) EPC-RNO_2 13,3%,** linha sólida (—), Condições experimentais: E_i = - 0,25 V; E_λ = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V e v = 100 mVs^{-1}.

A **figura 9** apresenta os VPD obtidos com EPC-RNO_2 13,3% e tempo de pré-condicionamento de 60 s à –0,6 V em solução de guanina 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em tampão BR, pH 8,0, voltamogramas **B** e **C,** respectivamente e apenas em tampão BR voltamograma **A**,.

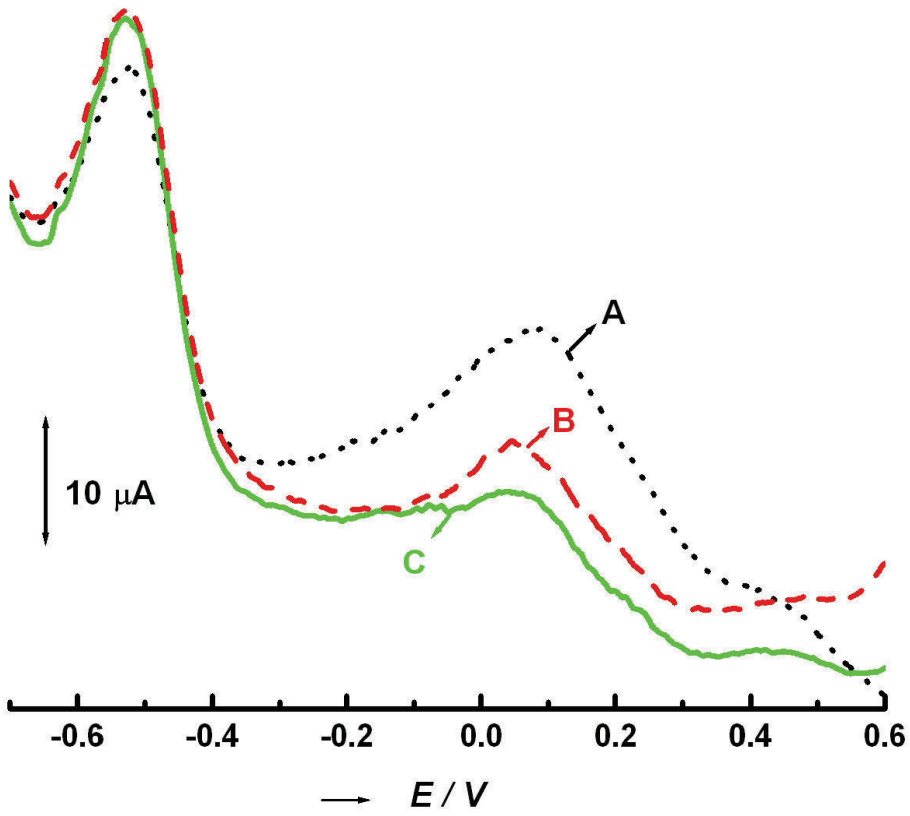


Figura 9. VPD obtidos com **EPC-RNO_2 13,3%** em: **A)** branco em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, pH 8,0 linha pontilhada **(·····), B)** solução de guanina 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} linha segmentada **(----), C)** solução de guanina 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; linha sólida **(—)** Condições experimentais: 60 s de pré-condicionamento a -0,65 V E_i = - 0,75 V; E_f = -0,25 V, v = 10 mVs^{-1} ampl. de de pulso = 50 mV; larg. de pulso = 70 ms

Diferente do observado quando o eletrodo era recoberto com o filme, ao se adicionar guanina em solução, houve um aumento no pico de oxidação do ânion-radical (- 0,55 V), porém ao se adicionar mais uma alíquota de guanina, este pico de oxidação manteve-se constante. Em relação ao segundo pico (+ 0,06 V) ao se adicionar guanina, ocorreu uma diminuição brusca de corrente, que pode ser interpretado como uma diminuição na concentração de hidroxilamina ou derivado nitroso RNO [42], para ser oxidada, o que indiretamente indica que a etapa de redução monoeletrônica estaria sendo favorecida. Nova diminuição de pico ocorreu ao se adicionar nova alíquota de guanina, tornando tal hipótese mais evidente, porém não foi possível detectar nenhum pico de oxidação de um novo produto, que se pudesse comprovar a interação entre a base de DNA e o nitro-radical.

Na **figura 10** e voltamograma **B,** são apresentados os VPD obtidos em solução de guanina 5,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em tampão BR, pH 8,0,usando EPC com tempo de pré-condicionamento de 60 s a -0,55 V. Pode-se observar apenas um pico de oxidação proveniente da oxidação de guanina em solução (Ep4 = + 0,81 V). Os voltamogramas **A**, **C** e **D** foram obtidos também em tampão BR pH 8,0, com EPC em **A** e com **EPC-RNO_2-G 13,3%** em **C** e **D**. O voltamograma **C** registrado em solução tampão, apresenta quatro picos de oxidação, o primeiro pico Ep1 à –0,52 V, proveniente da oxidação do nitro-radical $RNO_2^{\bullet-}$; o segundo pico que pode ser atribuído à oxidação da hidroxilamina (Ep2 = + 0,08 V) ou derivado nitroso; o terceiro, que pode ser referente a oxidação da 8-oxo-guanina, produto de oxidação da guanina e o quarto e último proveniente da oxidação de guanina presente no filme (Ep4 = +

0,81 V). Em seguida, obteve-se novo voltamograma, porém utilizando-se um tempo de pré-condicionamento de 60 s à – 0,6 V, voltamograma **D**. Houve um aumento de pico em Ep1 e diminuição de pico em Ep2, como já havia sido observado nos voltamogramas apresentados na figura 8, porém o pico responsável pela oxidação de guanina Ep4 praticamente desapareceu, restando apenas um ombro. Concomitantemente um último pico (Ep5 = +1,0 V) foi observado.

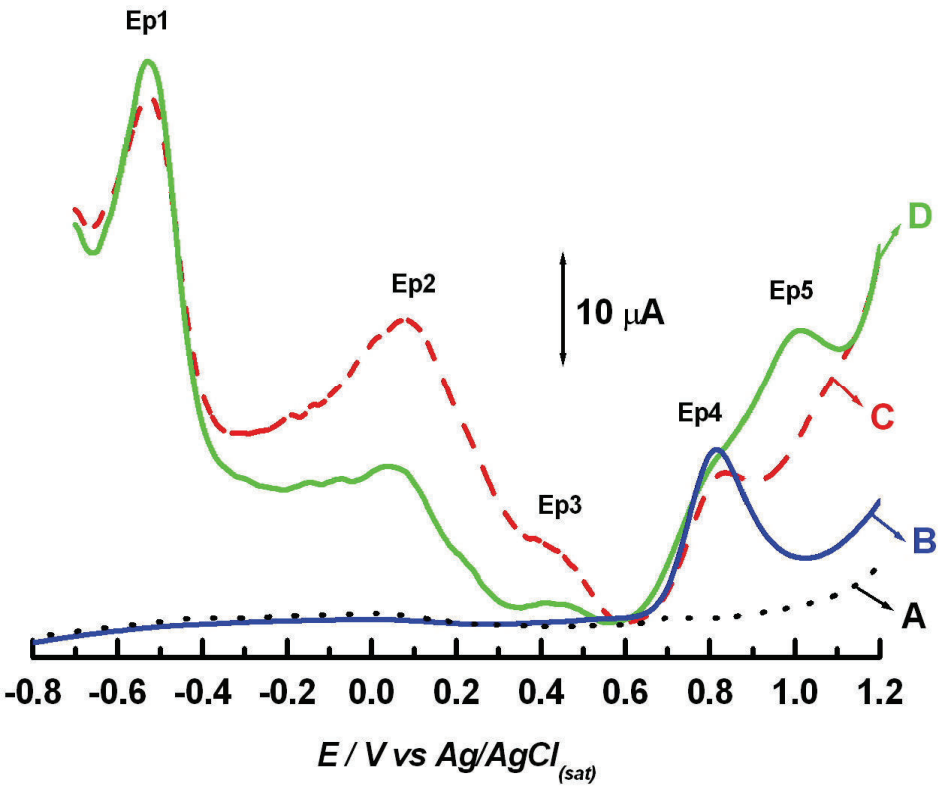


Figura 10. VPD obtidos com pré condicionamento : **A) EPC** em tampão BR, 0,2 mol L^{-1} pH 8,0 linha pontilhada (·····), **B) EPC** em solução de guanina 5,0 x 10^{-6} mol L^{-1} linha sólida (—). VPD Registrado com **EPC-RNO_2–G (13,3%)** em solução tampão BR 0,2 mol L^{-1}, **C)** sem pré condicionamento, linha segmentada (----), **D)** com pré condicionamento, linha sólida (—) Condições experimentais: 60 s de pré-condicionamento a -0,65 V E_i = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V, v = 10 mVs^{-1} ampl. de de pulso = 50 mV; larg. de pulso = 70 ms

Uma possível explicação para formação do processo observado em Ep5 seria a reação entre o nitro-radical, $RNO_2^{\bullet -}$ e a guanina imobilizada no eletrodo, para formar um cátion radical $G^{\bullet +}$. Este último, ao atacar outra molécula de guanina formaria $G^{\bullet}$ e duas destas poderiam ser dimerizadas [44], **esquema 2**.

$$GH - e^- \rightleftharpoons GH^{+\bullet}$$

$$GH + GH^{+\bullet} \longrightarrow G^{\bullet} + GH_2^{+}$$

$$2G^{\bullet} \longrightarrow GG$$

Esquema 2: Mecanismo de dimerização de guanina [44]

Tal proposta se baseia no mecanismo de oxidação de guanina, a primeira etapa envolve a oxidação da guanina e/ou guanosina com a perda de um elétron e um próton, levando a formação de um radical livre com um elétron desemparelhado na posição C(8). Este radical reage com guanina e/ou guanosina e água para produzir outros diferentes radicais livres, que sofrem uma série de reações químicas e eletroquímicas formando dímeros e trímeros da guanina e/ou guanosina, [45]. Por outro lado, a solubilidade da guanina em meio alcalino é maior, de modo que mesmo em baixas concentrações do radical guanil C(8) pode haver a produção de dímeros ou trímeros de guanina [46].

3.2.2. Eletrodos de pasta de carbono recobertos por filme de DNA – Concentração e condutividade.

Eletrodos de carbono vítreo, recobertos com DNA dupla hélice **(ds-DNA)**, foram modificados eletroquimicamente em solução de DNA degradado **(deg-DNA)** utilizando voltametria de pulso diferencial com etapas de pré-concentração a potenciais aplicados da ordem de +1,4 V [16,17,19,26,27,29,47,48]. A construção destes eletrodos modificados é simples, embora trabalhosa e morosa. Neste potencial, as bases purínicas do **deg-DNA (Guanina e Adenina)** em solução são oxidadas na superfície do eletrodo previamente modificado com **ds-DNA**. A modificação é permanente e origina uma fase condutora [48]. No entanto, este tipo de modificação não é recomendada para estudo de interação de fármacos-DNA porque o processo de modificação do eletrodo altera a integridade das bases.

Como citado, anteriormente, existem aplicações das mais variadas utilizando eletrodos modificados com DNA, dentre elas determinação de fármacos, contendo nitroimidazóis, como princípios ativos e o estudo do mecanismo de interação deste fármaco com DNA [49]. Eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono e DNA foram também utilizados para estudo da interação de azul de metileno e sua interação com as bases do DNA, em especial a guanina [50].

O maior desafio desta proposta foi encontrar a metodologia adequada para imobilização do DNA ou de suas bases, sem que a integridade das mesmas seja comprometida. Para dar continuidade aos resultados obtidos com

o nitrofural foram retomadas as idéias de imobilização do DNA para estudar a interação entre este composto e possivelmente outros, com as bases do DNA.

Duas possibilidades parecem ser bastante promissoras: a primeira delas consistiu em modificar os eletrodos com solução de **ds-DNA** enriquecido com as bases e a segunda em utilizar a eletropolimerização de filmes de lignina e lignina contendo metal previamente adsorvido para imobilizar a guanina, usada como sonda eletroquímica. Esta segunda possibilidade nos atraiu a possibilidade do metal complexado na estrutura do filme viabilizar a produção de radicais livres, *in situ*, quando em contato com a base, por meio da reação de Fenton ou reação similar [17].

Eletrodos de pasta de carbono foram recobertos com solução de DNA dupla hélice 80,0 mg L^{-1} em tampão acetato pH 4,5 e após secagem a temperatura ambiente por uma noite. Estes foram utilizados para obter voltamogramas cíclicos em solução de Ferricianeto de potássio 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Os resultados obtidos com estes eletrodos foram comparados com os eletrodos de pasta de carbono não modificados, **Figura 11**.

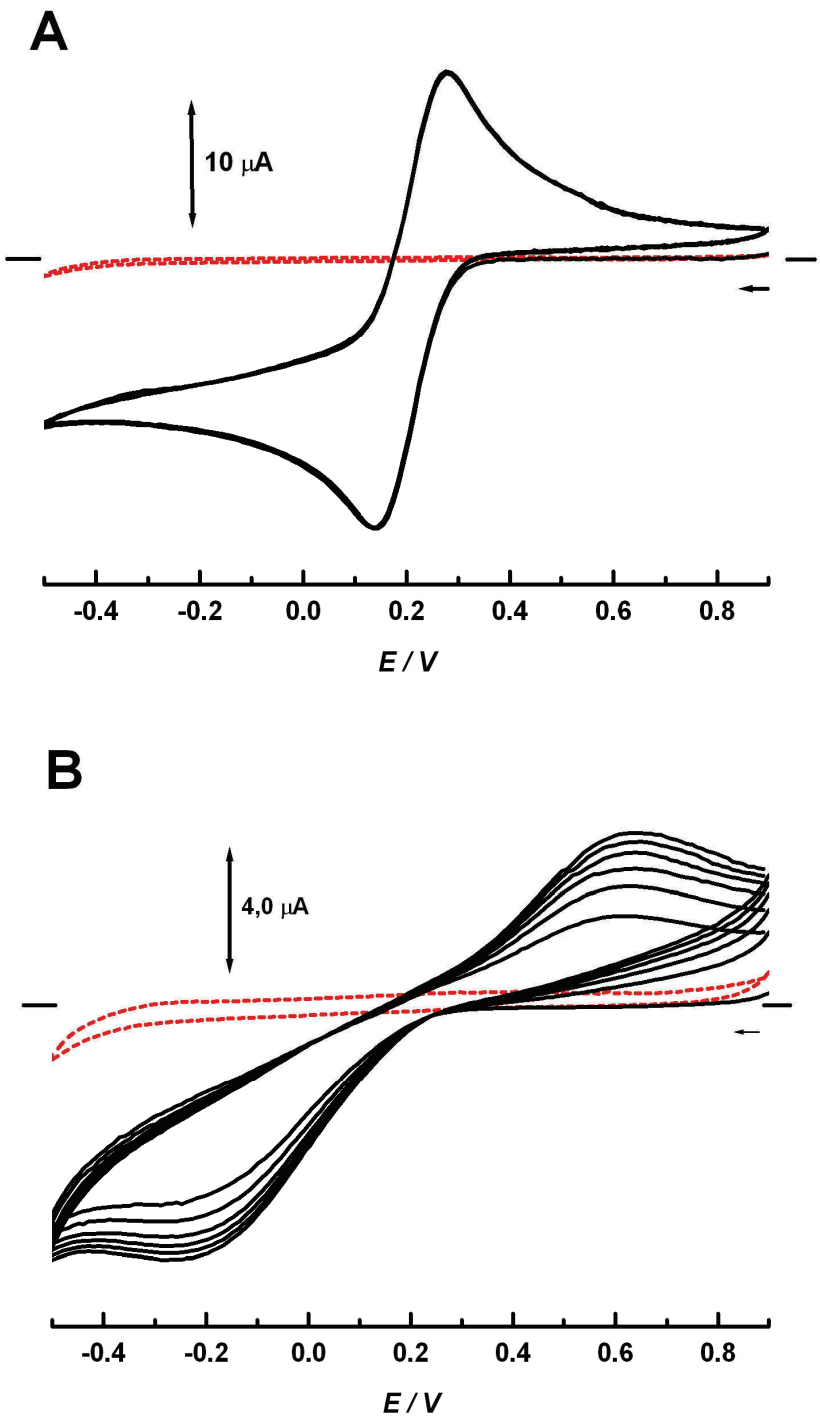


Figura 11. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de Solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,5 com eletrodos: **A) EPC** sem modificação e **B) EPC-DNA.** Condições experimentais: E_i = + 0,9 V; E_λ = - 0,5 V; E_f = + 0,9 V e v = 50 mVs^{-1}.

As **Figuras 11A** e **11B** apresentam uma série com seis voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos em solução de Ferricianeto de potássio 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, com eletrodo pasta de carbono (EPC) sem modificação e com eletrodo de pasta de carbono recoberto superficialmente com 50 µL de solução de DNA 80 µg mL^{-1} em tampão acetato pH 4,5 (EPC-DNA), respectivamente. Os valores de potenciais dos picos catódicos e anódicos obtidos com EPC foram Epc = +145 mV e de pico anódico Epa = +276 mV, com separação entre os picos de ΔEp = 131 mV. Os valores de correntes de pico catódico (Ipc) obtidos foram de -20,4 ± 0,3 µA e os de pico anódico (Ipa) foram de +19,7 ± 0,5 µA, com uma relação de Ipa/Ipc muito próximo da unidade, característico de um sistema reversível.

Os valores de potencial de pico catódico obtidos com o EPC-DNA foram Epc = -198 mV, cerca de +340 mV de deslocamento no sentido negativo e alargamento de pico indicativo de dificuldade de transferência eletrônica. No sentido anódico não foi diferente, com Epa = 588 mV, apresentando um deslocamento no sentido positivo de cerca de 310 mV e a separação entre os picos de ΔEp = 786 mV. Os valores de correntes de pico catódico (Ipc) obtidos foram de - 4,5 ± 1,1 µA e os de pico anódico (Ipa) foram de 2,5 ± 0,5 µA. Em ambos os casos a queda de sinal de corrente foi superior a 80%. Vale ressaltar que os valores de corrente não se mantiveram constantes, aumentando a cada voltamograma. De certa forma o comportamento praticamente irreversível já era esperado, uma vez que o filme de DNA impõe uma grande barreira à transferência de carga.

Em função da dificuldade de se trabalhar com eletrodos contendo compósito do tipo pasta de carbono mais nitrofural recobertos com filme de

guanina e, posteriormente, com eletrodos de pasta de carbono recobertos com filme de DNA, outras estratégias de modificação superficial de eletrodos de carbono foram avaliadas. Em todos os casos, buscava-se uma superfície em que os filmes de guanina ou de DNA pudessem ficar mais fortemente adsorvidos na superfície dos eletrodos, Assim deixando um pouco de lado a imobilização do DNA, partiu-se para o desenvolvimento de superfícies eletródicas que pudessem imobilizar substâncias com potenciabilidade de gerar radicais livres e ou que pudessem impedir a adsorção dos produtos de degradação do DNA ou de agentes antioxidantes. Após o desenvolvimento destes sistemas químicos seria retomado o estudo de interação com a guanina ou com o DNA, imobilizados na superfície do eletrodo.

No caso das superfícies eletródicas, explorou-se a potencialidade da lignina extraída do licor negro com ácido sulfúrico [34], lignina kraft (LK) para imobilizar nanotubos de carbono. No caso de sistemas químicos, capazes de produzir radicais livres intermediários, estudou-se a oxidação de derivados purínicos, neurotransmissores, quercetina como representante de espécies antioxidantes, peróxido de hidrogênio e nitrito.

Os resultados obtidos são apresentados nos próximos itens.

3.3. Lignina para modificação de eletrodos de carbono

As ligninas são substâncias amorfas, de natureza aromática complexa, compostas por unidades fenilpropanóides, denominadas C_6C_3, ou unidades C_9, e têm origem na polimerização desidrogenativa dos alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico [51-54]. A lignina é um dos mais importantes precursores do ácido fúlvico e este mantém algumas propriedades inerentes de sua molécula precursora, principalmente no que tange à complexação de metais [55]. A aplicação do ácido fúlvico como complexante de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn encontra-se bem documentada. No entanto, a utilização de métodos voltamétricos é ineficiente para caracterização das ligações metal-ligante, não só com o ácido fúlvico, como também com outros ligantes orgânicos de natureza complexa [56]. Esta característica de agente quelante e a facilidade de polimerização pode ser útil para obter superfícies com características catalítica e geradora de radicais livres.

3.3.1 Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina Kraft (LK) por ciclagem

O processo para a modificação dos eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina obedeceu às seguintes etapas:

(1) Limpeza mecânica do eletrodo de carbono vítreo **(ECV)** com polimento em feltro metalográfico com alumina 1,0 e 0,3 μm **(item 2.6).**

(2) Limpeza eletroquímica e ativação da superfície do **ECV** em solução NaOH. **(item 2.6).**

(3) Condicionamento do eletrodo de trabalho em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH 6,5 pelo registro de três voltamogramas cíclicos consecutivos nas seguintes condições: $E_{inicial}$: -0,2 V, $E_{\lambda.}$: +0,7 V, E_{final}: -0,2 V, ν = 100 mV s^{-1}, até estabilização da linha de base. Nesta etapa deve haver interação entre grupos funcionais da superfície ativada (quinonicos, fenólicos, carboxílicos, etc...) e íons HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$, podendo ocorrer ligação via pontes de hidrogênio.

(4) A formação do filme de lignina foi obtida por ciclagem em TF, pH 4,0 ou 6,5 contendo 0,1 g L^{-1} de LK.

Durante a etapa de ciclagem, a lignina é pré-concentrada e oxidada no eletrodo formando um filme polimérico condutor. Esta condição foi previamente otimizada, embora variações no processo de modificação tenham sido realizadas e serão discutidas em momento oportuno.

O comportamento eletroquímico da lignina foi avaliado pelo registro de voltamogramas cíclicos com eletrodos de carbono vítreo em solução de lignina 0,1 g/L em tampão fosfato, pH 6,5. Como descrito na literatura, observou-se um primeiro pico de anódico irreversível em +0,7 V, característico de derivados de catecolaminas entre outros, presentes na lignina, [55-58], que podem sofrer eletropolimerização. Após o registro de diversos voltamogramas observou-se a estabilização do perfil voltamétrico e a presença de um par redox com Epa= +0,42 V e Epc = 0,21 V, característico do par quinona/hidroquinona (dados não mostrados).

Eletrodos assim modificados, denominados de **ECV-Lig,** foram utilizados na detecção de dopamina. A **Figura 12A** apresenta o terceiro voltamograma cíclico de cada série de solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fostato, pH 6,5 com **ECV-Lig** (linha sólida), com o seu respectivo branco (linha tracejada). Como descrito anteriormente, o branco obtido com **ECV-Lig** apresenta um par redox permanente com Epa= 0,42 V e Epc = 0,21 V. A **Figura 12B,** apresenta o voltamograma obtido com **ECV** ativado em tampão TF pH 6,5, como descrito no processo de modificação com lignina.

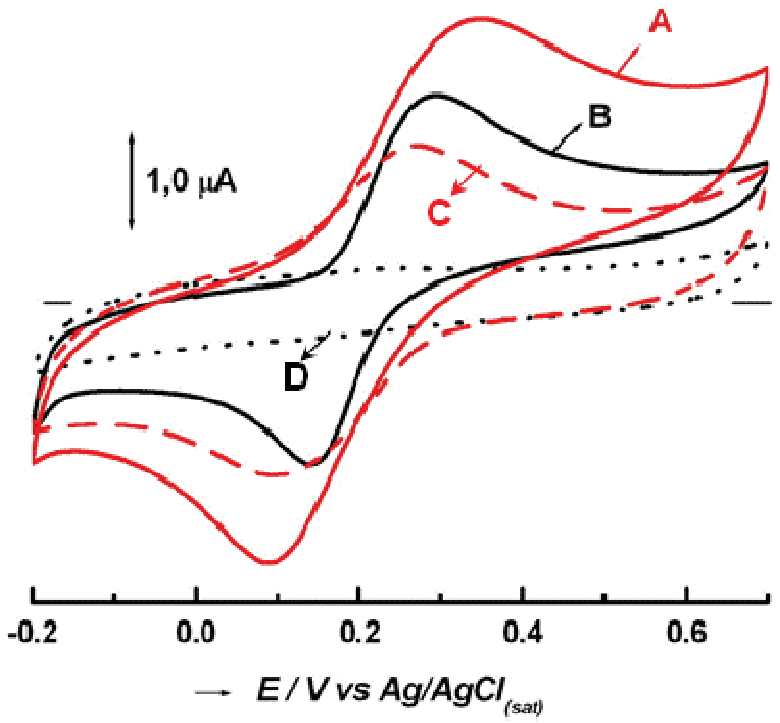


Figura 12 Voltamogramas cíclicos obtidos em Solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5 com seus respectivos brancos: **A) ECV-Lig** modificado em solução de lignina; **B) ECV** ativado em TF, pH 6,5; **C) ECV-Lig** em TF; **D) EVC** em TF, pH 6,5; Condições experimentais: E_i = - 0,2 V; E_λ = + 0,7 V; E_f = - 0,2 V e v = 100 mVs^{-1}.

Pode-se observar que não houve grande diferença nas respostas voltamétricas para os processos redox da dopamina, com um ligeiro deslocamento dos picos no sentido de dificultar o processo redox, com potenciais de pico para o **ECV-Lig** e **ECV** em Epa 0,31 V e 0,29 V e Epc 0,11 V e 0,15 V. Os níveis de corrente de pico apresentados nos voltamogramas com eletrodos modificados (Ipa = + 2,34 μA e Ipc = - 2,89 μA) foram bem maiores que os obtidos com eletrodos limpos, (Ipa = + 1,52 μA e Ipc = - 1,44 μA). O aumento de corrente obtido com **ECV-Lig**, deve estar relacionado à corrente de fundo de oxidação e redução do par redox do eletrodo modificado. Por outro lado, ao se observar a largura de pico do par redox, a largura de pico foi menor para **ECV** se comparado a **ECV-Lig EGP**, indicando que o processo de transferência eletrônica não foi facilitado.

3.3.2 Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina Kraft pela aplicação de potencial fixo.

Nossa experiência prévia [59] e estudos realizados com diversos catecóis [60-62] mostraram que o mecanismo de polimerização da dopamina, gerando melanina ocorre via etapas eletroquímicas e químicas. Assim, o pH da solução e aplicação do potencial contribuem para facilitar as etapas. Os íons HPO_4^{2-} presentes na superfície do eletrodo, provavelmente participam da etapa química [63], via formação de um complexo ativado, favorecendo a formação de um filme condutor com os produtos de oxidação da lignina. A fim de se obter

uma superfície mais condutora, avaliou-se a possibilidade da modificação do **ECV** em solução de lignina aplicando um potencial de oxidação fixo e altamente positivo durante o processo.

Em relação às etapas de modificação (1-4) descritas anteriormente, alterou-se a janela de potencial usada na etapa 3 (condicionamento em TF) para E_i = - 0,2 V; E_λ = + 1,5 e E_f = - 0,2 V. Além desta alteração, como já dito anteriormente, os filmes de lignina foram formados por aplicação de potencial de + 1,5 V ao eletrodo de trabalho durante 120 s.

Os eletrodos modificados em solução de lignina em TF pH 4,0 e 6,5, receberam as seguintes denominação, **ECV-Lig-4** e **ECV-Lig-6,5**. A **Figura 13A** apresenta o terceiro voltamograma cíclico obtido em solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fostato, pH 6,5 com **ECV** (linha sólida), com o seu respectivo branco (linha tracejada). As **Figuras 13B e 13C,** apresentam os voltamogramas obtidos com **ECV-Lig-4** e **ECV-Lig-6,5,** respectivamente. Pode-se observar, que diferente da modificação obtida por ciclagem **ECV-Lig**, que os brancos obtidos com **ECV-Lig-4** e **ECV-Lig-6,5** praticamente não apresentaram o par redox típico da lignina e que não houve grande diferença nas respostas voltamétricas em relação aos valores de potencial de pico de oxidação e redução para o par redox da Dopamina. Houve um ligeiro deslocamento dos picos no sentido de facilitar o processo eletroquímico com **ECV-Lig-4,0** e **ECV-Lig-6,5** apresentando respectivamente, Epa 0,23 V e 0,18 V e Epc 0,24 V e 0,18 V, em relação ao ECV, Epa 0,29 V e Epc 0,15 V. A antecipação de potencial em ambos os processos foi de 30 mV. No entanto, os níveis de corrente de pico apresentados nos voltamogramas com eletrodo modificado do tipo **ECV-Lig-6,5**

(Ipa = + 5,14 μA e Ipc = - 3,35 μA) foram bem maiores que os obtidos com **ECV-Lig-4,0**, (Ipa = + 3,28 μA e Ipc = - 2,36 μA) e com eletrodos limpos, (Ipa = + 1,52 μA e Ipc = - 1,44 μA).

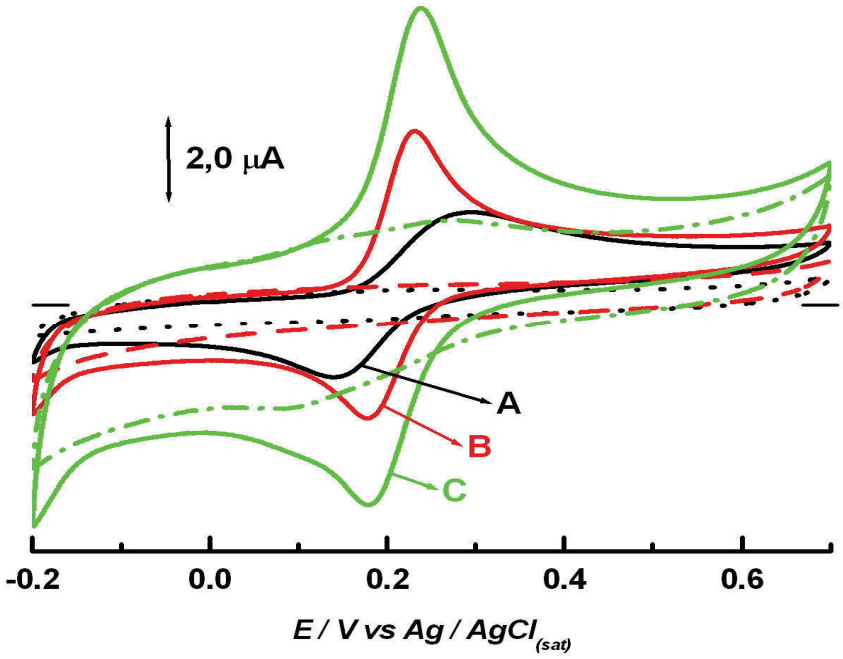


Figura 13 Voltamogramas cíclicos obtidos de Solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5 com seus respectivos brancos: **A) ECV** sem modificação e **B) ECV** modificado em solução de lignina em TF pH 4,0, **ECV-Lig 4,0. C) ECV** modificado em solução de lignina em TF pH 6,5 **ECV-Lig 6,5,** ambos modificados por condicionamento a +1,5 V, por 120 s. Condição experimental: E_i = - 0,2 V; E_λ = + 0,7 V; E_f = - 0,2 V e v = 100 mVs^{-1}.

Eletrodos de carbono vítreo foram modificados em solução de lignina em TF pH 2,0, 4,0, 6,5, 8,0 e 10, por tempo de 120 s de condicionamento a + 1,5 V, sob agitação. A **Figura 14A** apresenta os valores de corrente para o terceiro voltamograma cíclico obtidos em solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato, pH 6,5 com cada eletrodo modificado. Quando a modificação foi

realizada em pH 6,5, a resposta para dopamina apresentou os maiores valores de corrente de pico, tanto no sentido de oxidação, como no de redução. Diferente do observado com os valores de corrente, os valores de potencial de pico se alteram com a variação dos valores de pH durante o processo de modificação do eletrodo, **Figura 14B**.

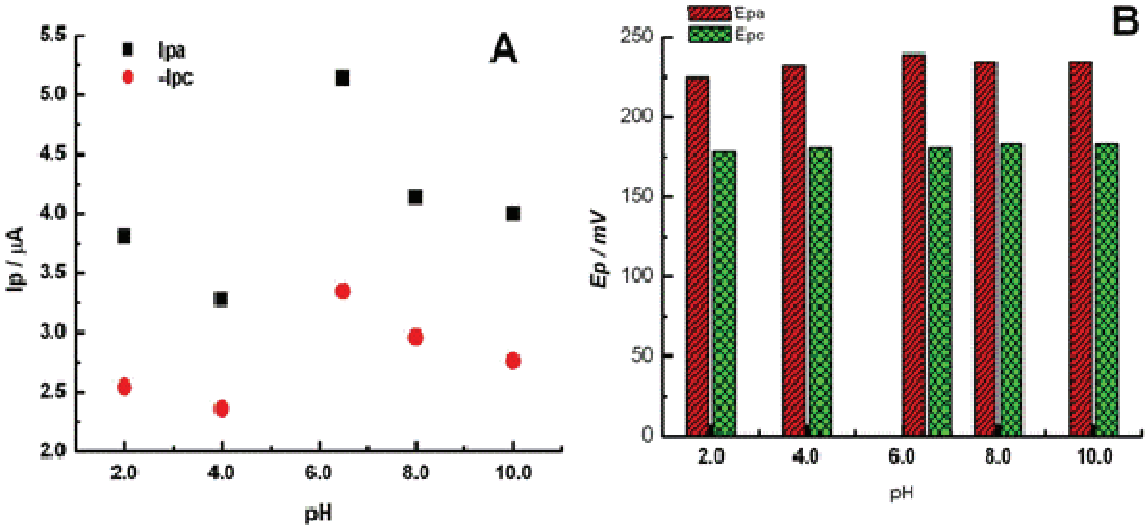


Figura 14. **A)** Valores de correntes de pico anódico (Ipa) e Catódico (Ipc). e **B)** Valores de potenciais de pico anódico (Epa) e catódico (Epa) Obtidos a partir dos,voltamogramas cíclicos obtidos como na **Figura 13**. Com **ECV-Lig** em diferentes pHs.

Podemos concluir que foi possível obter um filme polimérico condutor a base de solução de lignina, obtendo resposta eletroquímica em solução de dopamina. Assim o próximo passo foi avaliar a possibilidade de coimobilizar em tal filme, substâncias com características catalizadora e/ou que facilite o processo de geração de radicais livres, sendo usado com sonda, nanotubos de carbono e íons ouro.

3.3.3 Modificação de eletrodos de carbono vítreo em solução de Lignina em presença de tetracloroaurato

A Lignina apresenta propriedade complexante de metais [54,64] propriedade esta de grande interesse no desenvolvimento de sensores químicos, já que eletrodos limpos podem ser modificados em solução de lignina contendo metais de transição, visando sensores biomiméticos. As nanopartículas de ouro por sua vez possuem propriedades ópticas e condutoras singulares e, juntamente com as modificações com DNA, podem trazer uma nova perspectiva no desenvolvimento de eletrodos modificados com DNA.

O mesmo procedimento descrito no **item 3.3.2.** foi repetido, porém na solução de Lignina 0,1 g L^{-1} adicionou-se volume suficiente de solução de tetracloroaurato, de modo a obter concentração final de 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}**.** Em seguida aplicou-se o potencial fixo de +1,5 V durante 120 s ao eletrodo de trabalho, **ECV**. Após lavagem do eletrodo e célula eletroquímica obtiveram-se os voltamogramas cíclicos em eletrólito suporte, TF pH 6,5 até estabilização de linha de base.

ECV assim modificados foram denominados **ECV-Lig-Au,** e utilizados na redução de H_2O_2. Como pode se observar na **Figura 15,** curva C, o sinal para redução de H_2O_2 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} é significativamente maior do que o sinal obtido com ECV limpo, na mesma concentração de H_2O_2.

Estes estudos de co-imobilização de metais encontram-se na fase inicial de estudos, mas os dados obtidos mostram a potencialidade dos eletrodos modificados em soluções contendo lignina e metal, por aplicação de potencial fixo. O mais interessante é que a presença de metais de transição e H_2O_2 podem ocorrer formação de $OH^{\bullet}$, capaz de lesar o DNA.

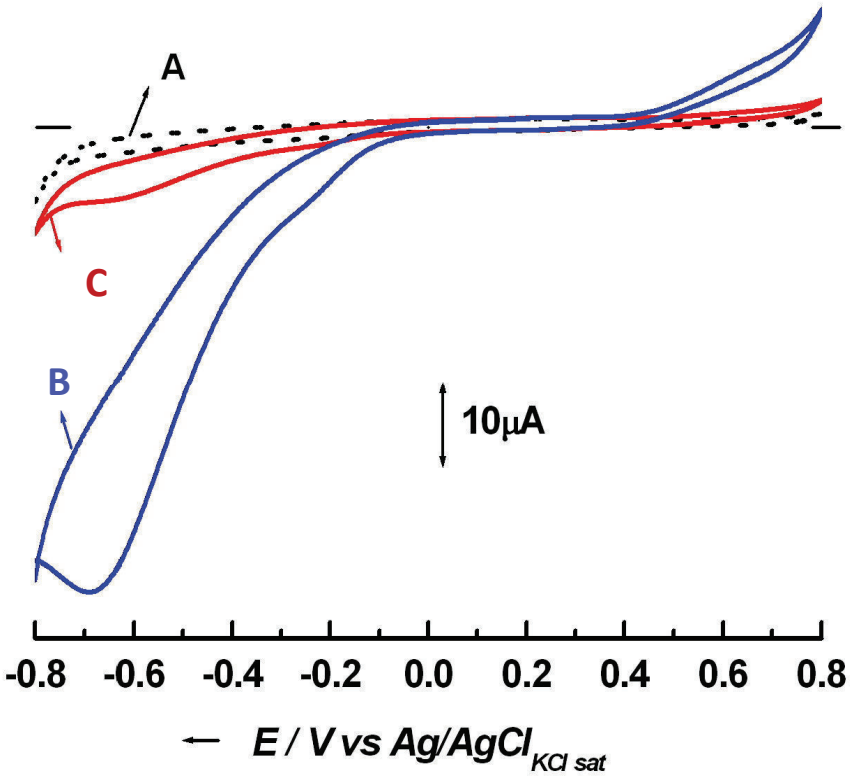


Figura 15. VC obtidos com **ECV-Lig-Au** em: **A)** branco em solução tampão TF 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5 linha pontilhada (·····), **B)** solução de peróxido de hidrogênio 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} linha sólida (—), **C)** voltamograma cíclico obtido com **ECV** nas mesmas condições solução de peróxido de hidrogênio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; linha sólida (—) Condições experimentais: 60 s de pré-condicionamento a -0,65 V E_i = - 0,75 V; E_f = - 0,25 V,

Uma das possibilidades aventadas para aumentar a condutividade da fase contendo o DNA ou as bases purínicas foi a utilização de nanotubos de carbono. Como o nosso grupo de pesquisa não tinha nenhuma experiência empregando este material, optou-se por preparar eletrodos de carbono vítreo modificados por deposição de nanotubos de carbono, porém se desejava utilizar procedimentos diferentes daqueles já descritos na literatura, em que os nanotubos são dispersos em brometo de cetilbutiltrimetil amônio, como descrito na construção de biossensores de glucose [65], ou mesmo em DNA para recobrimento de eletrodos de ouro e estudos de hibridização [50], em que a utilização de ultrassom poderia alterar a estrutura do DNA.

Aproveitando a experiência de nosso grupo na utilização de lignina para modificação de eletrodos, utilizou-se a lignina como matriz para dispersão de nanotubos de carbono.

3.3.4. Eletrodos de carbono vítreo modificados com compósito lignina-nanotubos de carbono. Determinação de íons nitrito.

O desenvolvimento e aplicação de nanoestruturas como materiais eletródicos [66,67] abriram novas perspectivas na eletroquímica e eletroanalítica e possibilitaram o desenvolvimento de novos métodos analíticos para solucionar antigos problemas. Dentre estes materiais, os nanotubos de carbono aparecem como alternativas de materiais eletródicos que podem ser usados sobre os mais diversos tipos de substrato fornecendo, uma ampla janela de potencial (característica dos materiais carbonáceos), além de outras

propriedades altamente interessantes como estrutura nanométrica, grande resistência mecânica, excelente flexibilidade, boa condutibilidade térmica e elétrica [68-70], e a possibilidade de modificações químicas superficiais pelos mais diferentes tipos de compostos.

Não tão recentemente, o grupo do Professor Richard Compton na Inglaterra [71], demonstrou que os sítios responsáveis pela atividade eletroquímica nos nanotubos de carbono não são diferentes daqueles envolvidos na atividade eletroquímica do grafite pirolítico, onde os defeitos contidos nos planos de borda fazem a diferença, quer seja na seletividade, quer na sensibilidade da resposta eletroquímica. Assim, a priori, não haveria nenhuma vantagem na utilização de nanotubos de carbono em relação aos eletrodos de grafite pirolítico, uma vez que a estrutura aberta no final dos nanotubos de carbono é similar aos planos de borda do grafite pirolítico [71,72].

A combinação da eletro-reatividade dos planos de borda com a morfologia especial e a estrutura nanométrica dos nanotubos de carbono pode conduzir a aplicações importantes. Este foi o caso da detecção do ácido desoxirribonucléico (DNA) realizada pelo grupo do Professor Joseph Wang [73]: os sinais de detecção foram amplificados quando eletrodos modificados com nanotubos de carbono foram utilizados. Além disto, a transferência eletrônica direta do centro da enzima *Glucose Oxidase* foi igualmente observada em nanotubos de carbono [65,74,75], cabendo salientar que até bem pouco tempo atrás, isto só tinha sido obtido, pioneiramente, com a enzima *Peroxidase*, pelo grupo do Professor Lo Gorton, na Suécia. Além do mais,

algumas moléculas podem interagir com os nanotubos de carbono de um modo que uma superfície de carbono polida não é capaz.

Há dois tipos de Nanotubos de Carbono: Nanotubos de Carbono de Paredes Únicas e Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas e dependendo da estrutura atômica desses materiais, eles podem se comportar eletricamente como um metal ou como um semicondutor. Os Nanotubos de Carbono possuem grande área superficial e estabilidade química, além de apresentarem atividade eletrocatalítica e diminuição do efeito de envenenamento de eletrodos, tornando-se dessa maneira materiais atrativos para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos [76,77].

A modificação de eletrodos com Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas para o uso em sensores eletroquímicos está bem documentada na literatura. Estes sensores quando associados ao uso de técnicas voltamétricas de pulso, permitem a obtenção de baixos limites de detecção, alta sensibilidade e diminuição de sobrepotenciais durante a quantificação de diversos analitos [78]. Assim, buscou-se aliar estas propriedades às características obtidas com os filmes poliméricos de lignina.

Em 5,0 mL de solução 1,0 g L^{-1} de lignina extraída com licor negro por precipitação com H_2SO_4 adicionaram-se 2,5 mg de **NTC** de parede múltipla. Essa mistura foi agitada e submetida a um banho ultrassônico durante 30 min. Após centrifugação (6.000 rpm) o compósito **NTCLK** foi separado da solução. Este processo foi repetido por cinco vezes até eliminação total da LK fracamente ligada. O material foi seco em estufa a 60 ºC e o pó obtido foi redisperso em dimetilsulfóxido e permanecendo estável.

O **ECV** foi previamente polido com alumína (1,0 e 0,3 μm) sobre feltro metalográfico, lavado com água e sonicado por 5 min em etanol : água (1 : 1, v/v) e ativado eletroquimicamente por ciclagem em TF 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 no intervalo de $-0,2 \leq E_{apl} \leq +1,7$ V a $\nu = 100$ V s^{-1}, até a obtenção de linha base estável.

Em seguida 10 μL da suspensão de lignina-nanotubos foram colocados sobre a superfície do **ECV**. Após secagem em estufa a 60 ºC. Este eletrodo modificado (**ECV-NTC-LK**) foi ciclado entre -0,2 e 0,8 V em *TF*, pH 7,4 a $\nu = 20$ mV s^{-1} até estabilização da linha base obtendo-se um compósito oxidado.

Uma vez que a superfície do eletrodo manteve-se estável, avaliou-se a possibilidade de usá-la para a determinação do íon NO_2^-, por ser este um importante precursor da formação de N-nitrosaminas que podem possuir elevada carcinogenicidade à saúde humana [79]. Esta espécie pode ser encontrada no ambiente, bebidas, em produtos alimentícios como conservante (embutidos e queijos) e componente natural em vegetais. A maioria dos métodos analíticos usados para a detecção e quantificação de NO_2^- inclui técnicas espectroscópica (Griess reaction), cromatográfica, eletroquímica (EQ) e eletroforese capilar [80]. Os métodos EQ são os preferidos visto que são rápidos, baratos e simples. Muitos deles baseados na redução do NO_2^- possuem alta sensibilidade [81], entretanto, estão sujeitos a interferências e poucos trabalhos enfocando a oxidação EQ de NO_2^- foram publicados [82].

A abordagem EQ oferece uma vantagem: não ocorre nenhuma interferência do íon NO_3^- e do O_2 molecular, substâncias limitantes na determinação catódica de NO_2^-, e envolvem um potencial relativamente elevado e lenta transferência de

elétrons. Os eletrodos modificados têm sido desenvolvidos para minimizar esses problemas e, até aumentar o intervalo de detecção nas determinações analíticas. Um dos artifícios que pode ser utilizado é o uso de nanotubos de carbono (NTC) para promover a redução de potenciais elevados de oxidação e facilitar, efetivamente, a transferência de elétrons [83]. A lignina (LK), principal constituinte não-carboidrato da madeira, é um complexo polifenólico formado pela polimerização, mediada por desidrogenases, de três monômeros fenilpropanóides: alcoóis coumarílico, coniferílico e sinapílico [84]. Durante o processo de polpação há a introdução de várias funcionalidades químicas permitindo a formação de LK solúveis. Baseado no fato de que a LK, quando imobilizada sobre a superfície de carbono vítreo é oxidada, produz eletroquimicamente grupos quinóides [Q], oriundos de seus grupos metoxi-fenil que são reversíveis na redução a hidroquinonas [HQ] formando um filme polimérico com características redox. As propriedades dos NTC associadas às da LK podem originar um compósito (NTCLK) imobilizado na superfície de um ECV que apresenta área superficial maximizada e atividades eletrocatalíticas, que pode ser empregado na construção de um eletrodo quimicamente modificado para a quantificação de traços de NO_2^- utilizando Voltametria de Pulso Diferencial (VPD).

A **figura 16A** mostra os voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos em TF 0,1 mol L^{-1} com **ECV-NTCLK**. No primeiro ciclo há uma oxidação em 480 mV da **LK** adsorvida em virtude da demetilação dos metoxifenil livres seguida da hidroxilação no anel contida no biopolímero produzindo *o*-quinona **[Q.]** [57,58]. Nos ciclos subsequentes, estabeleceu-se um processo quasi-reversível entre **[Q]/[HQ]** com as correntes de pico diminuindo, sucessivamente, até a

estabilização dos voltamogramas. O par de picos **[Q]/[HQ]** possui um $E_m(E_{pa} - E_{pc}/2)$ de 65 mV. Na **figura 16B**, uma série de **VC** do **ECV-NTCLK** foi obtida variando-se a velocidade de varredura (ν). Os picos de corrente foram diretamente proporcionais à ν indicando que o material está adsorvido na superfície do eletrodo e que a velocidade de transferência de elétrons é rápida entre a superfície do eletrodo e os centros redox do compósito. Estes resultados são similares aos obtidos por Milczarek [33].

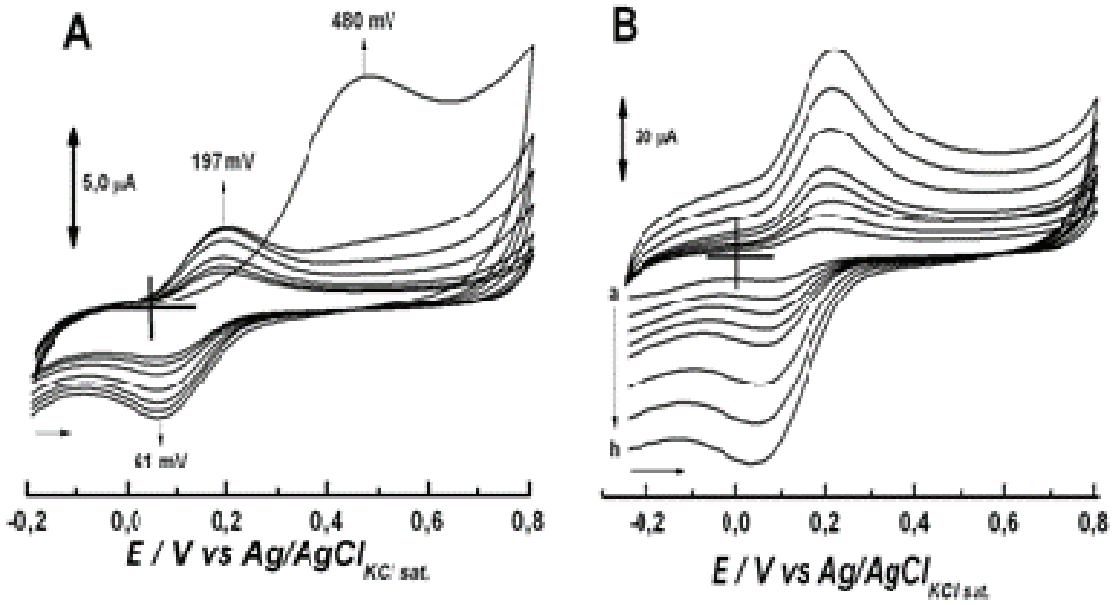


Figura 16. (A) Voltamogramas cíclicos contínuos de um *ECV-NTLK*. ν = 20 mV s^{-1}; (B) *VC* contínuos de um *ECV-NTLK* oxidado. ν = 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 e 150 mV s^{-1}. Eletrólito em (A) e (B): *TF* 0,1 mol L^{-1}, pH 7,4.

Superfícies que possuem o par redox **[Q]/[HQ]**, normalmente, são excelentes condutores de elétrons entre o eletrodo e as espécies em solução e, assim podem ser usadas em sistemas que possuem cinética de transferência de elétrons lenta e/ou sobrevoltagem. Por outro lado, há polímeros eletroativos

que, quando eletrodepositados em um eletrodo, podem suprimir ou inibir muitos processos redox de espécies em solução. Ambas as propriedades podem ser aplicadas em muitos processos tecnológicos. Assim, para a obtenção de informações sobre a natureza do compósito de **NTCLK** o **ECV-NTCLK** foi testado em alguns processos **EQ** bem conhecidos como $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ e $[Ru(NH3)_6]^{3+/2+}$ para verificar a possível aplicação em eletroanálise.

Em **ECV-NTCLK**, nenhum efeito eletrocatalítico foi observado em soluções contendo $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$, obtendo-se, ainda um aumento na diferença de potencial na separação entre os picos anódico e catódico, indicativo de uma reação quasi-reversível. Isto não ocorreu em soluções contendo o complexo de rutênio (III), que é catiônico. Por ser um complexo de esfera externa é insensível à modificação superficial dentro da camada e pode trocar elétrons com o eletrodo por tunelamento [85].

As correntes de pico de oxidação (Ipa), do ânion NO_2^-, foram obtidas em 730 mV, usando o ECV-NTCLK por DPV e utilizadas para construir a curva analítica no intervalo de $4,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} (**Figura 17A**). Os respectivos voltamogramas são apresentados na **Figura 17B.** Relação linear foi obtida entre Ipa *vs.* $[NO_2^-]$, no intervalo de $4,0 \times 10^{-6}$ – $8,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}. (**Figura 17B e 17C**).

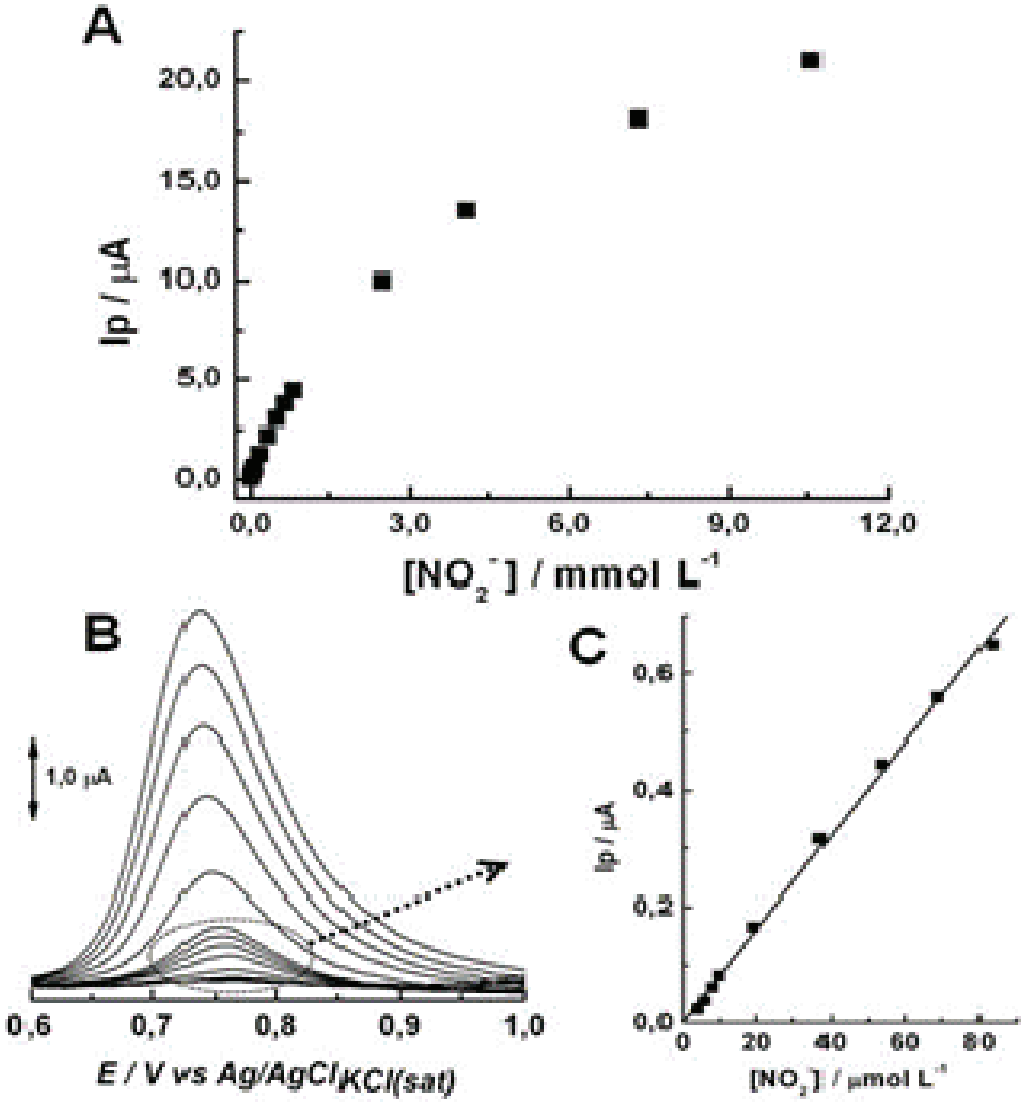


Figura 17. (A) Valores dos Ip_a obtidos por **VPD** para concentrações crescentes de nitrito (NO_2^-), nas [4,0 x 10^{-6} a 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}], com **ECV-NTLK**, em **TF** 0,1 mol L^{-1}, pH 7,4; (B) **VPD** obtidos durante a detecção de NO_2^- nas mesmas concentrações anteriores; (C) Curva analítica para NO_2^- no intervalo de 4,0 x 10^{-6} – 8,0 x 10^{-5} mol L^{-1}. ν = 10,0 mV s^{-1}; amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms;E_1 = 0,6 V; E_f = 1,0 V.

A equação de regressão linear obtida foi I(µA) = ((2,0 ± 0,7) + (8,0 ± 0,2)) x 10^{-3} [NO_2^-] (µmol L^{-1}), com um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,9937 e limite de detecção (s/n = 3) de 2,5 x 10^{-6} mol L^{-1}. O desvio padrão relativo de resposta a NO_2^- do ECV-NTCLK, para cinco medidas repetitivas, foi de 2,6% indicando uma boa precisão operacional. Medidas realizadas durante oito dias

demonstraram uma boa reprodutibilidade e atividade de 87% mantida durante o armazenamento em TF à temperatura de 23 ºC. Possíveis interferentes para a detecção de NO_2^- (5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) sobre o ECV-NTCLK foram investigados por VPD por adição de vários íons e moléculas, na mesma concentração de NO_2^-, em solução TF pH 7,4. Nitrato, cálcio, fluoreto não interferem. Mg^{2+}, SO_3^2, Br^-, NH_4^+ apresentaram capacidade de interferência menor que 10% (para menos); Fe^{2+} ≤ 35%; HCO_3^{2-} ≤ 55%; I^- e Cu^{2+} ≤ 7% e AU e AA ≤ 28%.

3.4 Eletrodos de Grafite Pirolítico modificados em solução de Dopamina [59] – detecção simultânea de Ácido Ascórbico (AA), Ácido Úrico (AU), Xantina (XA) e Hipoxantina (HX)

A biossíntese de nucleotídeos é um processo central para todas as células, sendo precursora direta do DNA e RNA, além de participar do metabolismo celular como transdução de energia, cofatores biológicos e sinalizadores de célula [5]. A maioria dos nucleotídeos resultantes da degradação de ácidos nucleicos, geralmente, sofre hidrólise enzimática sendo, normalmente, recuperados e reutilizados, porém cerca de 10% são degradados e seus produtos finais são excretados, principalmente na forma de ácido úrico [5,86]. Este último é o principal metabólito do catabolismo de purinas, possuindo como intermediários, devido à ação da enzima *xantina oxidase,* a hipoxantina e/ou xantina, **Figura 18**.

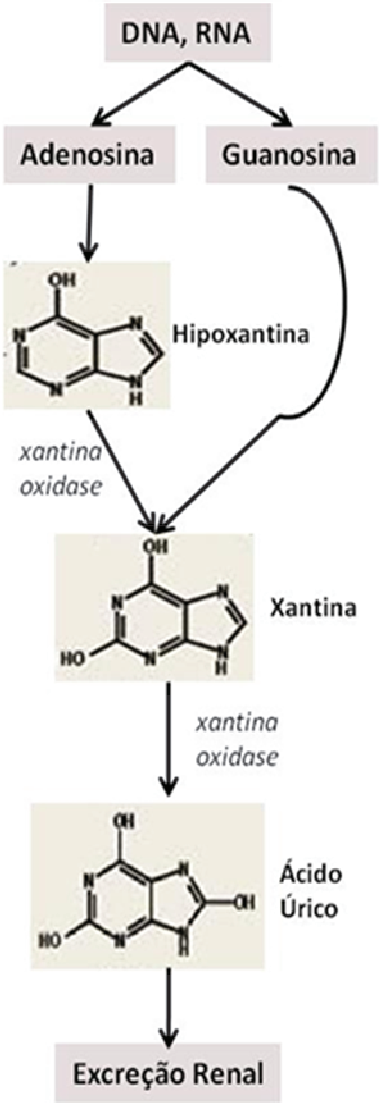


Figura 18: Mecanismo de degradação de Purinas

Perturbações do ciclo de purinas, como por exemplo, o estresse hipóxico leva ao acúmulo de purinas no cérebro [87], no coração e nos rins [88], o que pode ocasionar diversas doenças. Níveis elevados de ácido úrico e de oxipurinas no sangue, plasma e urina têm sido associados a determinados estados patológicos, incluindo, hiperuricemia, gota, insuficiência renal e pré-eclâmpsia, durante a gravidez [89,90].

O ácido úrico, cuja solubilidade no plasma é de 120 mg/dL a 37°C, apresenta-se predominantemente, na forma de urato monossódico, cuja solubilidade plasmática é cerca de 18 vezes menor que a do respectivo ácido, apenas 6,8 mg dL^{-1} à mesma temperatura. A ionização de ácidos é função de seu pKA, o do ácido úrico é 5,75, que é menor do que o pH do fluido extracelular, que está na ordem de 7,4, bem como da abundância de sódio no meio [90]. Explica-se, assim, a relativa facilidade de, em caso de hiperuricemia (elevação das taxas de ácido úrico no sangue), ocorrer formação de cristais de sais de urato que, ao se depositarem sobre juntas e articulações ósseas, iniciam o processo inflamatório que resulta na artrite gotosa. Na urina, com pH

em torno de 5,0, o equilíbrio reverte para a forma livre de ácido úrico, cuja solubilidade no meio é estimada entre 15 e 20 mg dL^{-1}.

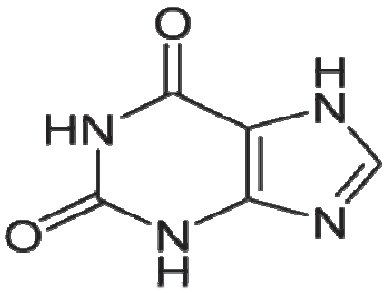


Figura 19: Estrutura molecular da Xantina

A Xantina (XA) é um intermediário formado durante o metabolismo de purinas (**Figura 19**). Quando encontrada em concentrações elevadas nos fluidos biológicos, pode indicar sintomas de doenças no trato urinário e nos músculos [5]. Derivados de Xantina são grupos de alcalóides comumente usados como estimulantes leves e como broncodilatadores. A determinação direta de Xantina por métodos voltamétricos com eletrodos convencionais é afetada pela presença de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA), hipoxantina (HX) e ácido úrico (AU) habitualmente presentes em amostras de urina [5]. A presença simultânea destas espécies, cujos potenciais de oxidação são muito semelhantes ao da Xantina, justificam a utilização do método enzimático, devido à sua alta versatilidade para a determinação deste analito. Entretanto, além de ser um método mais caro, geralmente envolve um processo de preparação meticuloso, no qual, em muitas ocasiões, o resultado é a redução de sensibilidade [91]. Assim, o desenvolvimento de superfícies modificadas que permitam a quantificação de Xantina na presença de outras oxipurinas e outros interferentes comumente encontrados em matrizes biológicas é altamente relevante.

Encontram-se ainda, na literatura, diversas abordagens aplicando métodos eletroquímicos enzimáticos [91] e sem a necessidade do emprego de enzimas. Estes métodos, geralmente, são bastante sensíveis, baratos e

rápidos. Alguns dispositivos para modificação de eletrodos foram elaborados para permitir a determinação simultânea de XA, HX e AU [92-94]. WANG *et al.* [92] utilizaram eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono e ZEN *et al.* [95] idealizaram um dispositivo composto de nontronita revestido de carbono impresso (NSPEs). Os limites de detecção para XA, nestes estudos, foram 1,5 x 10^{-7} mol L^{-1} e 7,0 x 10^{-8} mol L^{-1}, respectivamente.

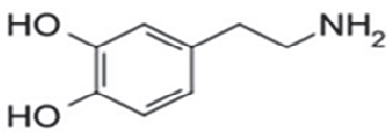
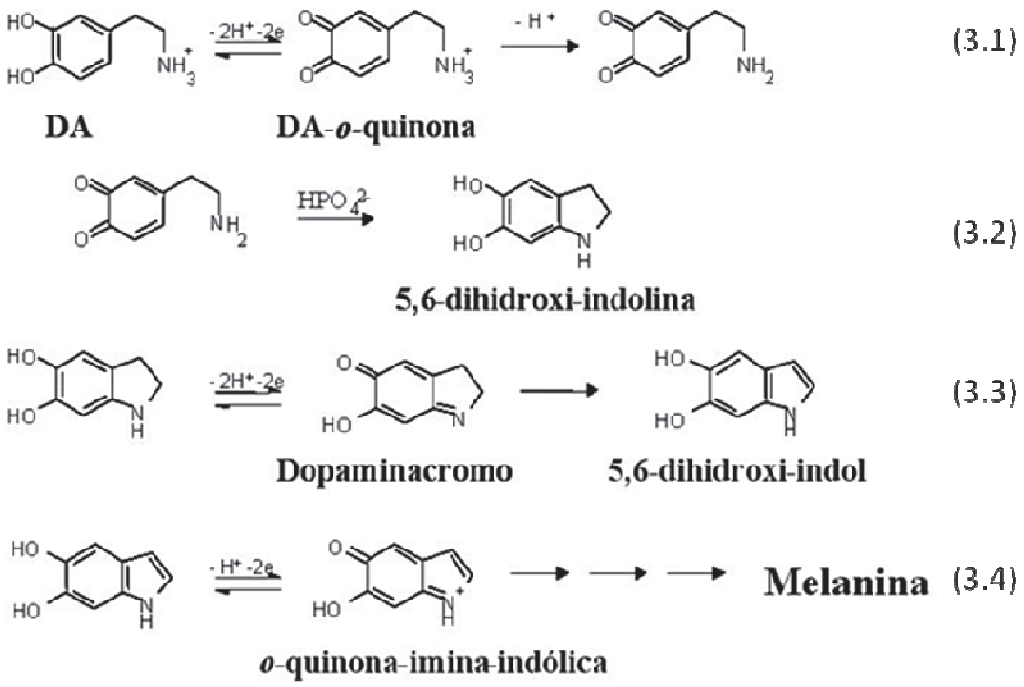


Figura 20: Estrutura molecular da Dopamina

Em busca de dispositivos eletroquímicos mais simples e tão eficientes como os citados anteriormente, SILVA *et al..* [59] utilizaram eletrodos de grafite pirolítico modificados com um filme polimérico de dopamina, sua estrutura é apresentada na **Figura 20**. Foram obtidos voltamogramas cíclicos em uma solução de (AA), (AU), (XA) e (HX) em tampão fosfato, pH 6,5, empregando eletrodo de grafite pirolítico modificado com dopamina (EGPD) e eletrodo de grafite pirolítico não modificado (EGP). A modificação permitiu a detecção simultânea dos analitos, como também proporcionou aumento significativo nos níveis de corrente quando comparado ao do eletrodo limpo. Este eletrodo proposto apresentou algumas vantagens como seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, forte aderência do filme à superfície do eletrodo, alta estabilidade química e excelente discriminação entre os picos de oxidação dos analitos em estudo e possibilitou a determinação simultânea de XA e HX em amostras de urina humana. Outros interferentes de interesse que potencialmente poderiam estar presentes em amostras biológicas também foram investigados. A adição de altos níveis de concentração de cloreto de potássio (5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}), citrato

de sódio (3,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) e glicose (2,5 x 10^{-3} mol L^{-1}) à celula eletroquímica não influenciaram os níveis de corrente e no potencial de oxidação de XA, quando obtidos os voltamogramas de pulso diferencial na concentração nominal de XA 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1},em tampão fosfato pH 6,5.

O eletrodo de grafite pirolítico eletroquimicamente modificado em solução de Dopamina (DA) previamente desenvolvido por Silva *et al.* [59] foi utilizado na determinação de Xantina e Hipoxantina em presença de interferentes como Ácido Ascórbico (AA), Ácido Úrico (AU) e Dopamina (DA). O mecanismo de formação do filme [96,97] é apresentado no **esquema 3** e **Figura 21**.



Esquema 3: Mecanismo de Oxidação da Dopamina

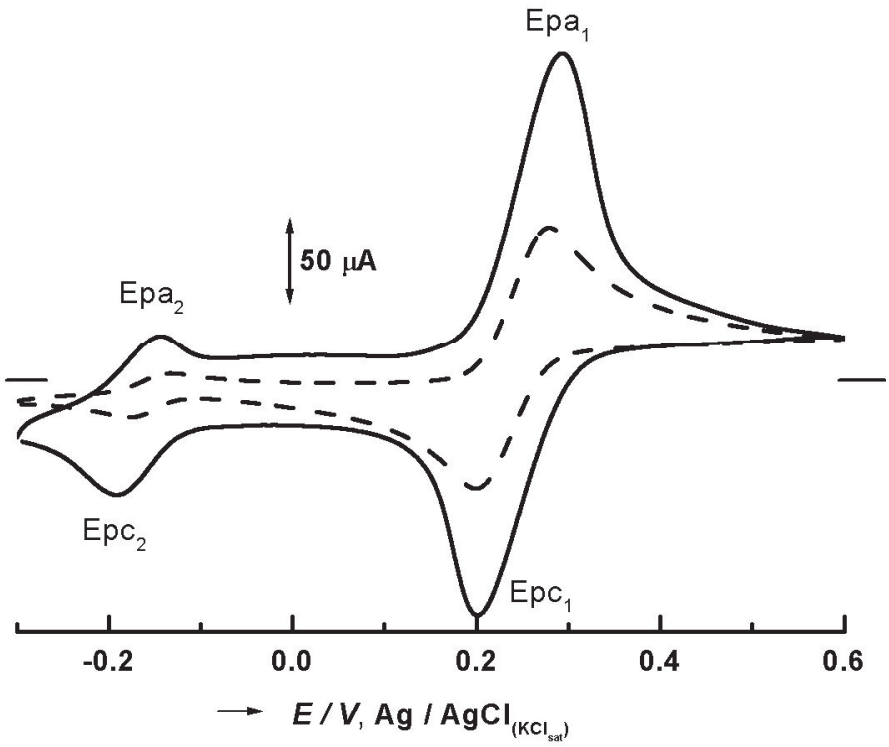


Figura 21. Quinto voltamograma cíclico obtidos em solução de dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em TF 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5 com eletrodo limpo **EGP** (linha segmentada) e eletrodo modificado **EGPDA** (linha sólida)**.** Condição experimental: 10 s de condicio-namento a 1,5 V. E_i = - 0,3 V; E_{inv} = 0,6 V; E_f = - 0,3 V e v = 100 $mVs^{-1.}$

Os picos Epc_2 e Epa_2 somente são detectados a partir do segundo voltamograma cíclico e correspondem ao par reversível descrito na etapa 3.3 do esquema 3. Buscando avaliar as propriedades permeseletivas do filme obtido eletroquimicamente em solução de dopamina foram realizados ensaios voltamétricos em tampão fostato, pH 6,5 com substâncias com caráter catiônico como o cloreto de hexa-aminrutênio (iii) e a dopamina (pka 8,20) além de substâncias com caráter iônico como ferricianeto de potássio; Ácido Ascórbico (AA) (pKa 4,17); Ácido Úrico (AU) (pKa 5,75); Xantina (XA) (pKa 7,44); e Hipoxantina (HX) (pKa 8,94), para avaliar se a resposta do filme se dava por

exclusão de carga. Os dados obtidos são apresentados na **Tabela II** e na **Figura 22**.

Como já abordado anteriormente, a **Figura 21** apresenta o quinto voltamograma cíclico de cada série de solução de Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fostato, pH 6,5 com **EGP** (linha tracejada) e com **EGPDA** (linha sólida).

Tabela II. Potencias e corrente de picos de processos redox de alguns analitos

Analito	Processo	EGP		EGPD	
		Ep (mV)	Ip (μA)	Ep (mV)	Ip (μA)
Dopamina Pico 1	Anódico	276	81,5	295	172,6
	Catódico	203	– 71,3	200	– 139,1
Dopamina Pico 2	Anódico	– 139	6,3	– 151	30,9
	Catódico	– 173	– 9,2	– 193	– 31,5
Rutênio	Anódico	– 143	34,9	– 155	30,9
	Catódico	– 208	– 38,7	– 235	– 48,3
Ferricianeto	Anódico	289	58,0	277	40,3
	Catódico	212	– 66,1	212	– 42,4
Ác. Ascórb.	Anódico	170	13,9	51	20,4
Ácido Úrico	Anódico	381	2,5	393	8,8
	Catódico	-----	-----	369	– 2,0
Xantina	Anódico	759	5,1	765	14,8
Hipoxantina	Anódico	1.089	4,6	1.083	12,0

O aumento de corrente obtido com **EGPD**, deve estar relacionado a um efeito de pré-concentração. Por outro lado, ao se observar a largura de pico do primeiro par redox (Ep1) ele foi menor para **EGPD** se comparado a **EGP**, indicando que o processo de transferência eletrônica foi acelerado. Como a dopamina neste pH está carregada positivamente, há um indicativo de que não houve repulsão por parte do filme formado de Dopamina na superfície do eletrodo. Com base nesta observação avaliou-se o comportamento da superfície modificada com outros analitos, para assim caracterizar algumas propriedades do filme: atuar por exclusão por carga ou exclusão por tamanho, acelerar o processo de transferência de carga ou se apenas apresenta efeito de pré-concentração.

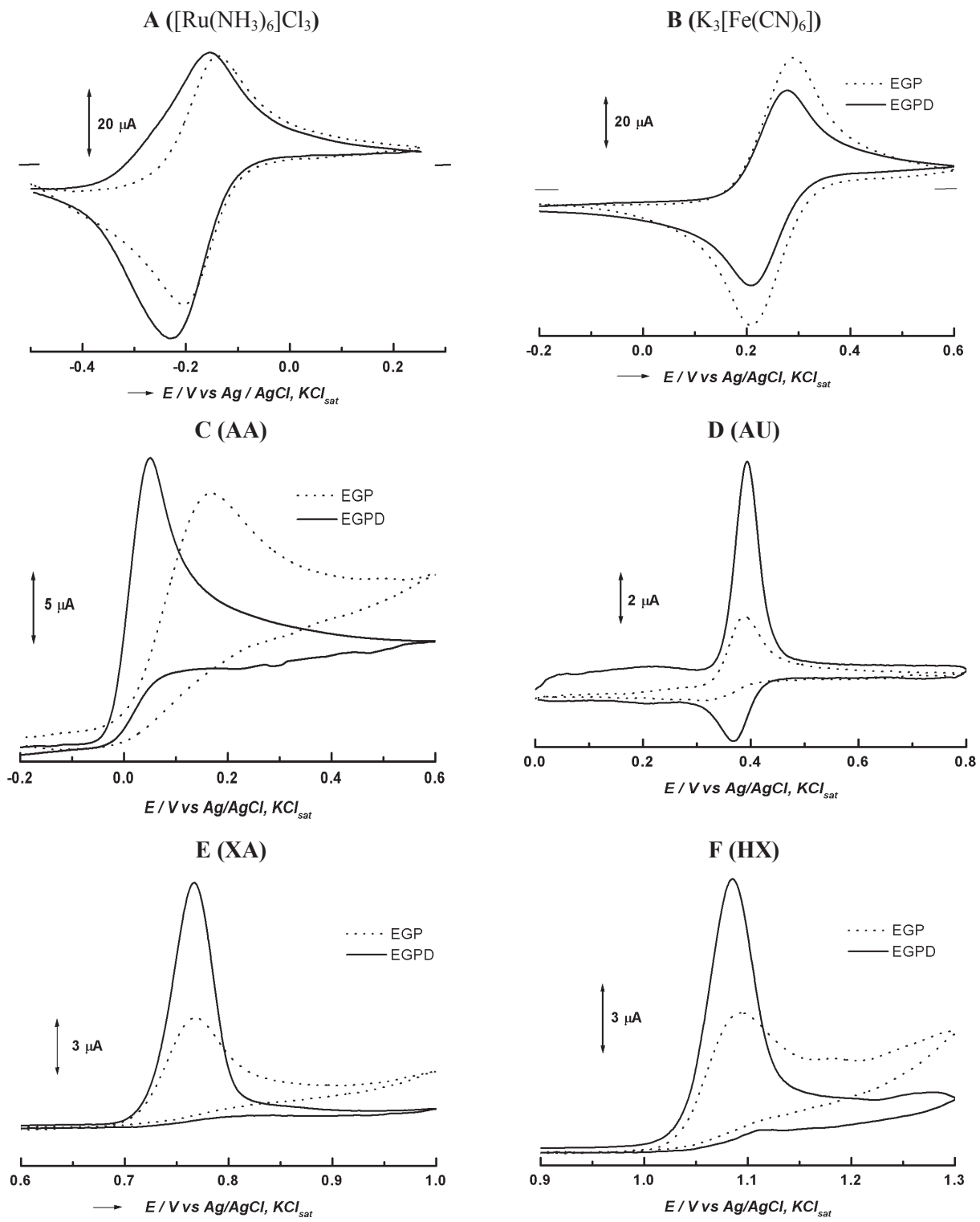


Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos em: **A)** solução de $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, **B)** Solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, **C)** ácido ascórbico(AA) 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, **D)** ácido úrico (AU) 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, **E)** Xantina (XA) 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} e **F)** Hipoxantina (HX) 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, todos em TF 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5 com **EGP** (linha segmentada) e **EGPD** (linha sólida)**.** Condições experimentais: 10 s de condicionamento a 1,5 V. E_i = - 0,3 V; E_λ = 0,6 V; E_f = - 0,3 V e v = 100 mVs^{-1}.

No eletrodo modificado, o voltamograma obtido em solução de cloreto de Hexa-aminrutênio (III) (**Figura 22A)**, apresentou um ligeiro deslocamento do potencial de oxidação e de redução no sentido negativo, com uma pequena diminuição nos níveis de corrente anódica e um ligeiro aumento nos níveis de corrente catódicas. Houve ainda dificuldade nos processos de transferência de carga para oxidação e redução, observada pelo alargamento dos picos. Neste caso, a dificuldade de oxidação e redução não pode ser creditada à repulsão do analito pela superfície do eletrodo, uma vez que este efeito não foi observado em solução de dopamina.

Para as espécies carregadas negativamente no pH em que as medidas foram realizadas, com exceção do par $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, que apresentou diminuição nos níveis de corrente, houve um aumento considerável nos níveis de corrente para os Ácidos Úrico e Ascórbico, este último ainda foi cataliticamente oxidado, pois houve antecipação no potencial de oxidação em 120 mV, em relação aos dados obtidos com o **EGP**.

Concluiu-se que tanto as espécies aniônicas como as catiônicas permearam o filme eletrogerado, não havendo, portanto, exclusão por carga. Logo, deve haver exclusão por tamanho, já que as respostas voltamétricas com **EGPD**, só não apresentaram melhora quando comparadas com **EGP**, para ferricianeto de potássio e cloreto de Hexa-aminrutênio, substâncias com maior volume molar dentre as analisadas. Para Xantina e Hipoxantina, analitos de interesse também houve um grande aumento nos níveis de corrente de pico de oxidação e redução, indicando que houve melhora na cinética de transferência

de carga. Assim, pode-se concluir que esta modificação de eletrodos pode ser utilizada satisfatoriamente para determinação dos analitos estudados.

Eletrodos modificados em solução de Dopamina **EGPD** foram utilizados para determinação de Xantina e em diferentes valores pH e em diversas velocidades de varreduras, com estes estudos buscava-se avaliar alguns parâmetros eletroquímicos. Para avaliação de pH ótimo na determinação de Xantina variou-se o pH na faixa entre 2,0 – 10 utilizando em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1}. As medidas voltamétricas foram efetuadas primeiramente em tampão fosfato no pH de estudo até estabilização da linha base e, em seguida, foi adicionado à célula solução de XA com a concentração de 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicatas sendo escolhido o valor mediano de corrente ou potencial para cada valor de pH. As **Figuras 23A** e **23B** apresentam, respectivamente, os valores de corrente e de potencial de oxidação obtidos para a oxidação da Xantina em cada valor de pH estudado.

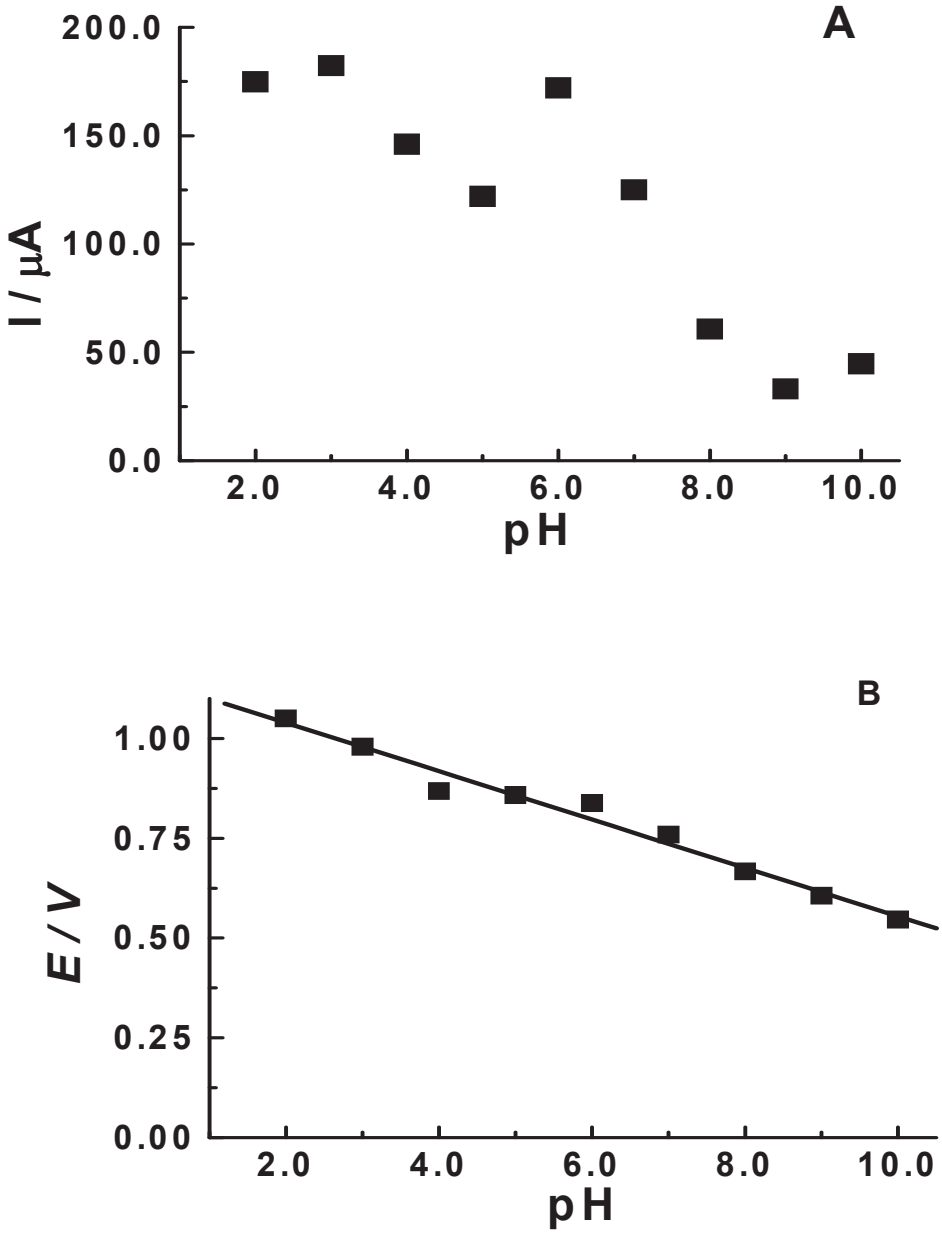


Figura 23 Gráficos obtidos a partir de Voltamogramas de pulso diferencial em solução de Xantina de 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em diferentes valores de pH, com **EGPD**: (**A**) corrente de pico *vs.* pH. (**B**) potencial de oxidação *vs.* pH . Velocidade de varredura = 10,0 mV s^{-1}, amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms e E_i = +0,4 V; E_f = +0,9 V.

Como pode ser observado na **Figura 23A**, foram obtidos maiores valores de correntes para oxidação de Xantina em meio ácido, porém o processo de oxidação é facilitado com o aumento do pH, ou seja, potencias mais baixos para oxidação de Xantina foram obtidos em meio básico. Assim, o pH escolhido para as medidas voltamétricas na determinação de Xantina foi o pH 6,5. Essa escolha foi motivada pelo fato se trabalhar na faixa de pH fisiológico, ou seja entre 6,0 e 8,0, o que facilita medidas realizadas em matrizes biológicas. Nesta faixa de pH, o potencial de oxidação para Xantina foi mais baixo do que os obtidos em valores de pH menores que 6,0 e os níveis de corrente de oxidação foram maiores para valores de pH acima de 8,0.

Com o já abordado anteriormente, houve variação do potencial de pico no sentido negativo com aumento do pH de acordo com a equação linear Ep/V = 1.16 (± 0,02)V – 0,061 (± 0,03) pH. O valor do coeficiente angular está muito próximo do valor teórico de – 60mV pH^{-1}, indicando no processo de transferência eletrônico estão envolvidos o mesmo número de prótons e de elétrons.

As correntes de pico apresentados na **Figura 24** foram obtidas a partir de voltamogramas cíclicos variando-se a velocidade de varredura para solução de XA 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, em TF pH 6,5 e utilizadas na construção do gráfico de Ip x $\upsilon^{1/2}$.

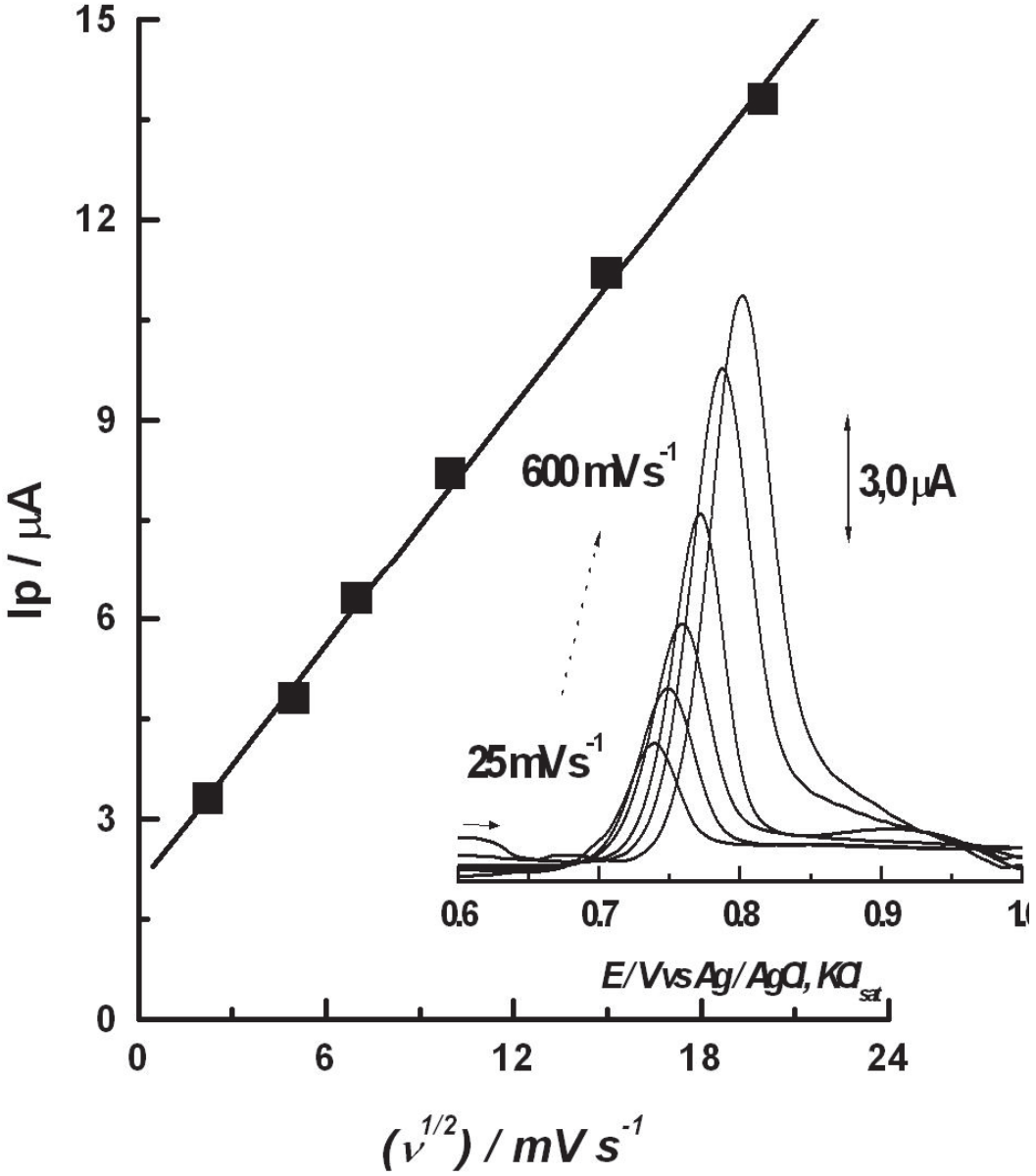


Figura 24 Curva Ip *vs.* $\nu^{1/2}$. *Inset*: componente anódica de V.C. obtidos com **EGPD** em solução de Xantina de 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5. Velocidades de varredura:10; 25; 50; 100; 225; 400 mV s^{-1}, E_i = +0,4 V; E_λ = +1,2 V E_f = +0,4 V. Ip = 2,0±0,2 + 0.60 ± 0,01 * $\upsilon^{1/2}$

Os dados de corrente apresentados na **Figura 24** foram extraídos dos voltamogramas que se encontram inseridos nesta figura, porém os voltamogramas cíclicos apresentados foram subtraídos de seus respectivos brancos e a figura apresenta apenas o sentido anódico dos voltamogramas

cíclicos, semelhante a uma voltametria de varredura linear. Os valores de corrente foram obtidos da subtração do branco.

Os valores de corrente aumentaram linearmente com o aumento da velocidade de varredura, obedecendo a equação Ip = 2,0 (± 0,2) / μA+ 0.60 (± 0,01) $\upsilon^{1/2}$ para valores de velocidade de varredura entre 10-400 mV s^{-1}, indicando que o processo de oxidação da Xantina é dado de forma difusional.

O produto da oxidação eletroquímica da hipoxantina é a xantina, e o da xantina é o ácido úrico que sabidamente adsorve fortemente na superfície do eletrodo e, talvez este seja o motivo pelo qual a curva Ip vs. $\nu^{1/2}$ não passa pela origem.

Como em amostras biológicas AA, AU, XA e HXA coexistem, avaliou-se a possibilidade da detecção simultânea destas espécies em tampão fosfato, pH 6,5, com **EGP** e **EGPD**. A **Figura 25** apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos na detecção simultânea de AA (1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}), AU (5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}), XA (5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}) e HX (5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}). Observa-se que além da discriminação dos picos dos ácidos ascórbico e úrico utilizando **EGPD**, houve um grande aumento nos níveis de corrente de pico para os quatro analitos em relação aos valores obtidos com **EGP**, um indicativo que seria possível determiná-los simultaneamente com grandes vantagens. No **EGPD**, a separação de picos entre AA e AU foi de 351 mV, entre AU e XA foi 363 mV e entre XA e HXA foi 321 mV. Estes valores, para eletrodos não modificados foram 184, 413 e 336 respectivamente, salientando que, neste caso, as correntes de pico foram muito inferiores àquelas obtidas com o eletrodo modificado.

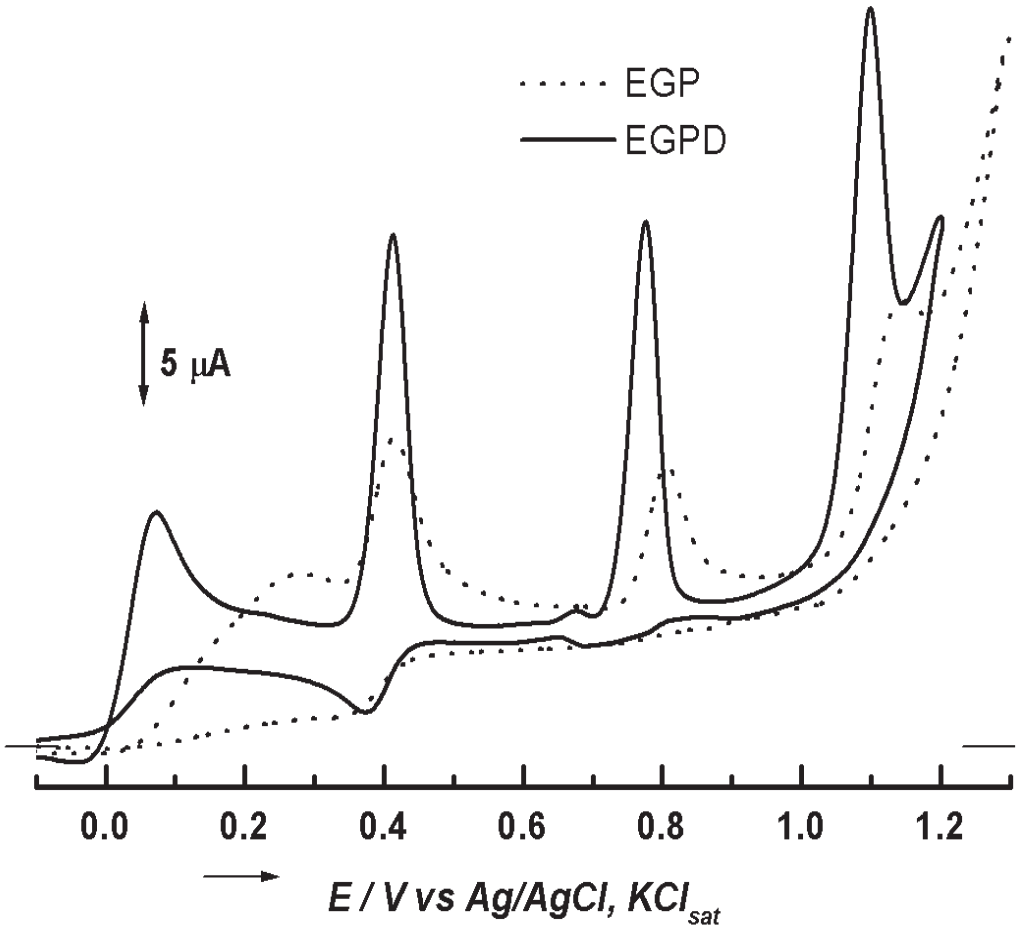


Figura 25. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de grafite pirolítico modificado em solução de Dopamina em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5, contendo: AA: 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; AU: 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}; XA: 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} e HXA 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}. Velocidade de varredura = 10,0 mV s^{-1}, amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms e E_i = -0,2 V; E_f = + 0,9 V.

Além do estudo descrito acima, foram realizados alguns experimentos com outros interferentes que poderiam estar presentes em amostras biológicas. A adição de altos níveis de concentração de cloreto de potássio (5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}), citrato de sódio (3,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) e glicose (2,5 x 10^{-3} mol L^{-1}) à célula eletroquímica não influenciaram nos níveis de corrente e no potencial de oxidação de XA presente em concentração nominal de XA 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1},em tampão fosfato pH 6,5.

A **Figura 26** apresenta os valores de corrente em função da concentração, obtidos por voltametria de pulso diferencial, para a construção de uma curva analítica para Xantina no intervalo de 1,0 x 10^{-6} a 8,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Pode-se observar por esta figura que o trecho linear da curva está entre 1,0 x 10^{-6} a 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Para concentrações mais elevadas, os valores de corrente de picos já não respondem linearmente às sucessivas adições de xantina, indicando que houve saturação da resposta do eletrodo, para concentrações de Xantina superiores a 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

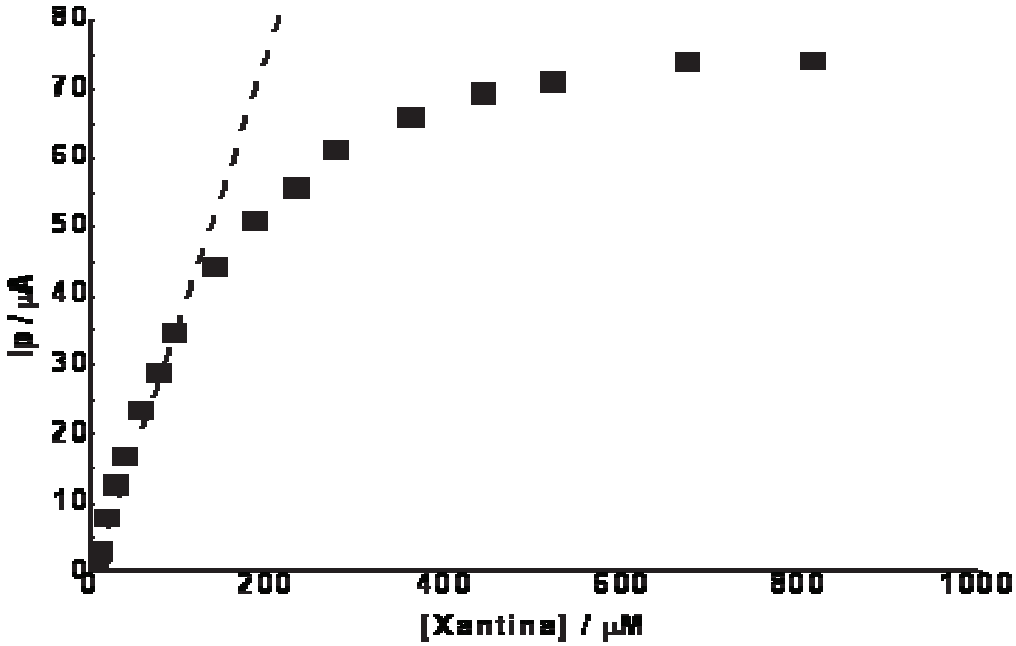


Figura 26 Curva analítica para determinação de XA. Os valores de corrente foram obtidos com o **EGPD** a partir de voltamogramas de pulso diferencial em solução de 1,0 x 10^{-6} ≤ **[XA]** ≤ 8,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em TF pH 6,5. Velocidade de varredura = 10,0 mV s^{-1}, amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms e E_i = 0,5 V; E_f = + 1,2 V.

Eletrodos **EGPD** foram utilizados nas determinações simultânea e isolada de XA e HX. Para determinação simultânea os voltamogramas foram obtidos após adição de concentrações crescentes de solução HX (7,5 x 10^{-6} mol L^{-1} a 7,5 x 10^{-5} mol L^{-1}) em tampão fosfato pH 6,5 mantendo constante a concentração de Xantina em 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} na célula eletroquímica, **Figura 27A,** e para XA (7,5 x 10^{-6} mol L^{-1} a 7,5 x 10^{-5} mol L^{-1}), mantendo constante a concentração de Hipoxantina em 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, **Figura 27B**. Para cada valor de concentração deste analito, registraram-se três voltamogramas consecutivos de pulso diferencial, mantendo a etapa de pré-concentração de 10 s a +1,5 V entre um voltamograma e outro.

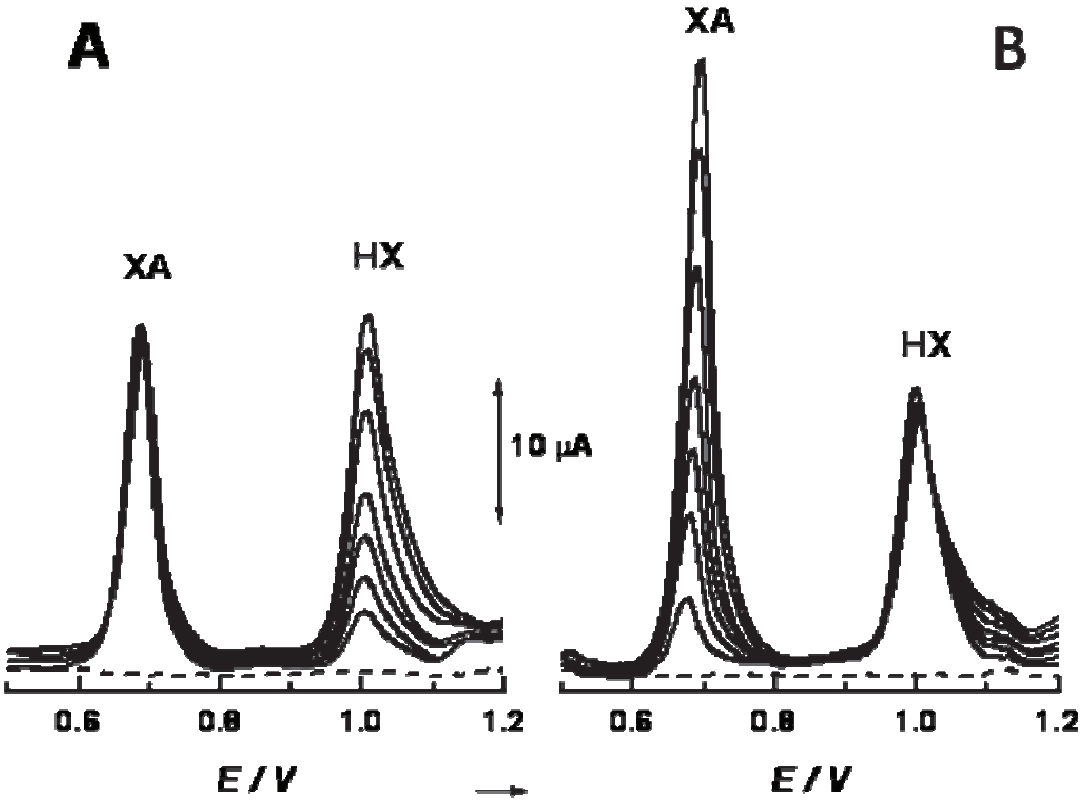


Figura 27. VPD obtidos em concentrações crescentes de: **A**) 7,5 x 10^{-6} ≤ **[HX]** ≤ 7,5 x 10^{-5} mol L^{-1}, mantendo a concentração fixa de **XA** em 5,0x 10^{-5} mol L^{-1} em TF pH 6,5; **B**) 7,5 x 10^{-6} ≤ **[XA]** ≤ 7,5 x 10^{-5} mol L^{-1}, mantendo a concentração fixa de **HX** em 5,0x 10^{-5} mol L^{-1} em TF pH 6,5 . Velocidade de varredura = 10,0 mV s^{-1}, amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms e E_i = 0,5 V; E_f = + 1,2 V.

A **Figura 28A** apresenta as curvas analíticas obtidas com **EGPD** para a determinação de hipoxantina em presença de altas concentrações de xantina e *vice e versa*. Os dados de corrente foram extraídos antes da subtração do branco e alisamento das curvas. Em cada ponto de concentração durante as adições crescentes de Xantina ou Hipoxantina foram obtidos três voltamogramas e os valores de corrente de pico utilizados na construção das curvas analíticas foram obtidos a partir dos valores medianos.

Para determinação dos analitos isoladamente, os voltamogramas foram obtidos em solução de Xantina na faixa de concentração de 7,5 x 10^{-7} mol L^{-1} a 6,0 x 10^{-5} mol L^{-1} e para Hipoxantina na faixa de concentração de 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1} a 7,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. Da mesma maneira anterior, os valores de corrente medianos foram obtidos a partir do registro dos voltamogramas em cada ponto de concentração e utilizados na construção da curva de corrente em função da concentração de cada analito. Estes voltamogramas não foram apresentados, porém as curvas analíticas foram apresentadas na **Figura 28B**.

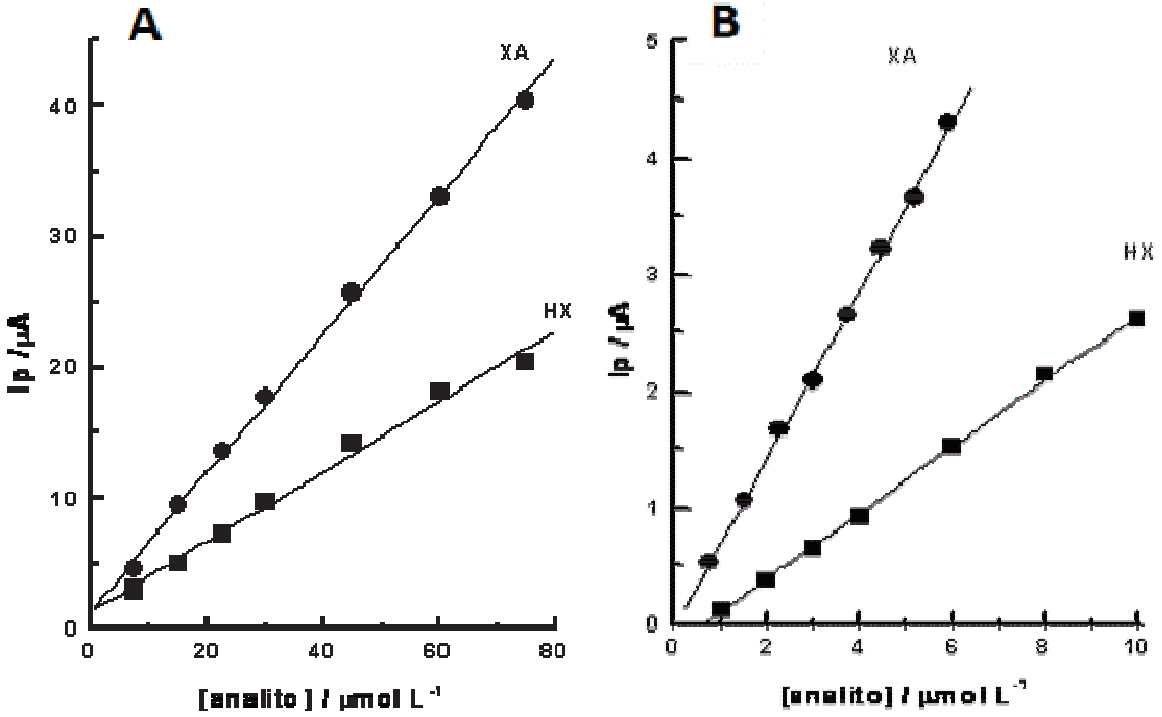


Figura 28. A) Curvas analíticas obtidas na detecção simultânea de XA ou HX obtidas através dos VPD apresentados na **Figura 26** , **B)** Curva analítica obtida detectando Xantina e Hipoxantina isoladamente, na faixa de 7,5 x 10^{-7} ≤ **[analito]** ≤ 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. Velocidade de varredura = 10,0 mV s^{-1}; amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms e E_i = +0,5 V; E_f = + 1,2 V.

A partir das curvas analíticas apresentadas nas **Figuras 28A e 28B** foram obtidos os seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção calculado [98] para detecção simultânea de Xantina, 2,3 x 10^{-6} mol L^{-1}; sensibilidade calculada, de 2,8 A mol^{-1} L cm^{-2}; e R^2 = 0,999. Para determinação simultânea de Hipoxantina estes parâmetros foram: limite de detecção 5,6 x 10^{-6} mol L^{-1}; sensibilidade de 1,4 A mol^{-1} L cm^{-2}; e R^2 = 0,990. A partir desses valores, pode-se afirmar que é possível a determinação simultânea de tais analitos.

Quando os limites de detecção foram calculados para XA e HX a partir de soluções isoladas dos analitos, os valores obtidos foram respectivamente,

1,7 x 10^{-7} mol L^{-1}, 2,1 x 10^{-7} mol L^{-1}, porém os valores de concentração utilizados na construção das curvas foram 10 vezes menores, sendo realizado nas seguintes faixas de concentrações para Xantina 7,5 x 10^{-7} mol L^{-1} a 6,0 x 10^{-5} mol L^{-1} e para Hipoxantina 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1} a 7,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. Esses valores são da mesma magnitude ou ainda menores do que os encontrados atualmente na literatura [92-94].

Foram efetuadas quatro curvas analíticas consecutivas, sendo duas nas determinações simultâneas dos analitos e outras duas na determinação isolada de cada analito. Utilizaram-se apenas etapas de limpeza ao final de cada curva analítica, envolvendo a manutenção do eletrodo de trabalho no eletrólito suporte por 10 s a +1,5 V. Deste modo, o processo de modificação foi efetuado uma única vez, não havendo modificação superficial posterior.

Os eletrodos **EGPD** foram utilizados para determinação de Xantina ou Hipoxantina em amostras de urina. Os resultados obtidos em amostras de urina para XA e HX foram de 0,47 μM e 5.9 μM, respectivamente.

Deste modo desenvolveu-se um método voltamétrico sensível com limite de detecção semelhante aos encontrados na literatura [92-94]. O método é preciso e rápido na determinação de Xantina e hipoxantina. Esta estratégia será posteriormente, utilizada na determinação de Xantina em amostras biológicas. A modificação superficial do eletrodo em solução de DA permite, ainda, a determinação simultânea de Xantina, Dopamina, Ácido Úrico e Ácido Ascórbico, pois como observado com os eletrodos modificados, obteve-se uma resposta voltamétrica com a separação nítida entre os picos de oxidação destes analitos. A modificação eletroquímica produziu sobre a superfície do

eletrodo um filme constituído pelos produtos de oxidação da Dopamina, responsável por evitar efeitos de adsorção da Xantina ou de seus produtos de oxidação na superfície do eletrodo.

Este processo de modificação de eletrodo de grafite pirolítico proposto é fácil de ser efetuado, permitindo a determinação de Xantina em presença de altas concentrações de possíveis interferentes como de Ácido Ascórbico, Cloreto de Potássio, Citrato de Sódio e Glicose.

3.5 Modificação superficial de eletrodos de carbono vítreo em solução de Serotonina por filmes Gerados Eletroquimicamente

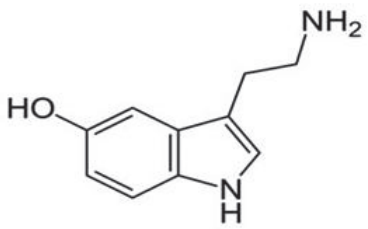


Figura 29: Estrutura molecular da Serotonina

Serotonina (5-HT), **Figura 29** derivado do triptofano (Trp), é um neurotransmissor importante, porém está relacionado a diversas doenças como distúrbios de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, depressão e estresse pós-traumático [99]. A dopamina (DA), outro importante neurotransmissor, intermediário da conversão de tirosina (Tyr) em adrenalina (EP) e noradrenalina (NE), desempenha diversas funções do sistema nervoso central, contudo está envolvida nos processos como a esquizofrenia e doenças degenerativas motoras, como o mal de Parkinson [100]. Um dos problemas associados à detecção eletroquímica e quantificação simultânea de DA e 5-HT é a proximidade entre os potenciais de pico correspondentes à oxidação de

ambos, bem como a coexistência de outros neurotransmissores e outros interferentes, como (AA), em amostras biológicas. Outro problema encontrado na determinação destes analitos é a forte adsorção dos produtos de oxidação na superfície dos eletrodos causando envenenamento do transdutor [101]. A determinação eletroquímica destes compostos tem sido realizada em conjunto com outras técnicas, como a cromatografia, eletroforese capilar e FIA [59,102-104]. A utilização de eletrodos quimicamente modificados vem se apresentando como alternativa na determinação destes compostos [101, 105-107]. Eletrodos modificados por filmes poliméricos foram utilizados na determinação de 5-HT e DA em presença de interferentes [21,59,108-110].

Nesta tese, descreve-se um método alternativo rápido, barato, sensível e preciso para detectar, simultaneamente, DA e 5-HT, utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD), com eletrodo de carbono vítreo modificado eletroquimicamente em potenciais altamente positivos e em solução de 5-HT.

3.5.1. Modificação do eletrodo de carbono vítreo em solução de serotonina

A modificação dos ECV foi efetuada de maneira similar aos procedimento descrito no item 3.3.1 e 3.4, apenas substituindo a solução modificadora, ou seja, o ECV foi polido em feltro metalográfico com alumina, lavado e mantido em banho de ultrassom (4 min.), submetido a tratamento eletroquímico em NaOH 0,1 mol L^{-1}, aplicando-se +1,5 V por 120 s, sob agitação. O filme polimérico foi formado aplicando ao ECV um potencial de +1,5 V por 120 s, sob agitação, em solução 5-HT ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) em TF, pH 4,0.

A **Figura 30**, apresenta o voltamograma cíclico **(VC)** obtido com eletrodo limpo **(ECV)** em solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de serotonina **(5-HT)** em TF 0,1 mol L^{-1}, pH 6,5. Observou-se um único pico (Ep = 410 mV, Ip = 0,9 μA), atribuído à oxidação da serotonina. Utilizando o eletrodo modificado **(ECV-5HT)**, este pico deslocou-se para regiões menos positivas de potencial (31 mV) e os níveis de corrente triplicaram (Ep = 379 mV, Ip = 3,1 μA), um indicativo de que existe efeito catalítico associado a este processo. Observou-se também que houve diminuição na largura de pico, indicando que o filme polimérico de 5-HT aumentou a velocidade do processo de transferência eletrônica.

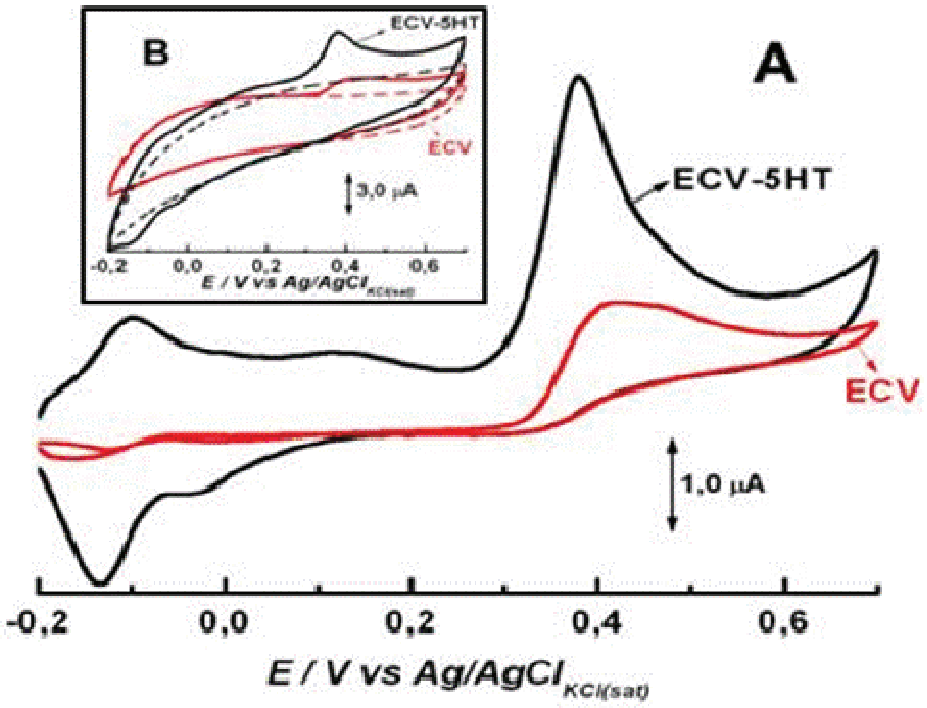


Figura 30. VC obtidos em solução de 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de 5-HT em TF 0,1 mol L^{-1}, com ECV-5HT e ECV. **A)** VC subtraído de seu respectivo branco. **B)** VC normal com seu respectivo branco (linha pontilhada). E_i = -0,2 V; E_λ = 0,7 V; E_f = - 0,2 V e v = 50 mVs^{-1}.

As correntes deste pico variaram linearmente com $\nu^{1/2}$ (r = 0,993), sugerindo um processo eletroquímico controlado por difusão [102]. Com o aumento de ν (25 – 900) mV observou-se um deslocamento de Ep para valores mais positivos. O eletrodo modificado mostrou ainda a existência de outros processos anódicos e catódicos, com maior destaque para o processo redox com Epc = -135 mV e Epa = -95 mV, atribuído ao par Quinona/ Hidroquinona, gerado durante a oxidação da serotonina. Estes produtos adsorvem fortemente à superfície do eletrodo, fato comprovado pela variação linear das correntes de pico com o aumento de ν. Resultados similares foram obtidos por Sarada *et al*. [102].

Mesmo após a modificação do eletrodo os produtos de oxidação da 5-HT adsorvem em sua superfície, a simples aplicação de um potencial positivo

no eletrodo de trabalho é suficiente para a limpeza superficial e manutenção do filme inicialmente formado. No entanto não é qualquer potencial aplicado que produz a superfície modificada. O potencial foi variado e os seguintes valores foram usados como potenciais de condicionamento (E_{cond}): - 0,3 V; + 0,2 V (antes de Epa de 5-HT); + 0,4 V (Epa de 5-HT); 0,7 V (depois de Epa de 5-HT) e + 1,5 V (potencial de modificação), no intervalo de varredura de - 0,3 a 0,7 V.

O processo de limpeza superficial do eletrodo foi monitorado pelo processo de oxidação da 5-HT e a adsorção de seus produtos de oxidação aumentou com o deslocamento de E_{cond} no sentido positivo. Comparando os terceiros voltamogramas obtidos em cada série, observou-se que quando o potencial de condicionamento variou no sentido anódico de potencial houve diminuição de 86% nos níveis de corrente, com variação de Ip de 1,79 a 0,25 μA, além do deslocamento de Ep no sentido positivo (Ep 0,36 → 0,40 V) e alargamento de pico.

No entanto, ao se aplicar + 1,5 V por 20 s em eletrólito suporte ou na solução do analito de interesse observou-se, em relação ao E_{cond} de - 0,3V, deslocamento de Ep de 40 mV no sentido negativo, aumento e estabilização nos níveis de corrente, além da diminuição na largura de pico (Ep = 0,32 V, Ip = 2,45 μA). O efeito da variação do E_{cond} foi também efetuado com ECV-limpo, resultados similares foram obtidos, porém os efeitos de envenenamento foram mais pronunciados.

VPD foram obtidos com **ECV-5H** em solução 2,0 x 10^{-5} mol L^{-1} de 5-HT e DA em TF na faixa de 2,0 ≤ pH ≤ 10. Obtiveram-se variações lineares para Ep *vs.* pH, com R^2 0,997 e 0,973, e inclinações de -61 e -52 mV/pH para DA e 5-HT, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os encontrados na

literatura, pois ambos os processos anódicos envolvem dois prótons e dois elétrons [59, 102]. Maiores valores de Ip foram obtidos para 5-HT e DA em pH 6,5 e 4,0, respectivamente, com diminuição brusca de sinal para valores de pH ≥ 8,0. Optou-se pela realização das demais medidas em pH 6,5, pelos maiores valores de corrente obtidos e menores valores de Ep observados para 5-HT.

Eletrodos ECV-5HT foram utilizados para construção de curvas analíticas a partir de soluções contendo concentrações crescentes de DA e 5-HT, com detecção isolada e simultânea dos dois analitos no intervalo de 2,0 x 10^{-7} a 2,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. A **Figura 31A**, apresenta os VPD obtidos após cada adição de mesma concentração para DA e 5-HT. Foram realizadas quatro curvas consecutivas, com sete valores de concentração em cada uma. Para cada valor de concentração, os VPD foram obtidos em triplicata. Considerando o branco, foram obtidos 128 VPD, sem a necessidade de renovação de superfície. Grandes variações de Ip não foram observadas para cada valor de concentração. A **Figura 31B** apresenta os valores médios de Ip para cada concentração, bem como seus respectivos desvios, para as quatros curvas. Obteve-se relação linear Ip_a vs [5-HT], para as curvas simultanêas e isoladas, com as seguintes equações: I(μA) = -0,012 + 0,17 [5-HT] (μmol L^{-1}) e I(μA) = (-0,008 + 0,204 [5-HT] (μmol L^{-1}), coeficientes de determinação (r^2) igual a 0,993 e 0,994 e limite de detecção (s/n = 3) de 2,8 e 2,9 x 10^{-8} mol L^{-1}, respectivamente. A relação de Ip_a vs [DA], também foi linear com I(μA) = 0,077 + 0,367 [DA] e I(μA) = 0,040 + 0,69 [DA] (μmol L^{-1}), r^2 igual a 0,973 e 0,962 e limite de detecção (s/n = 3) de 1,3 e 1,7 x 10^{-8} mol L^{-1}, para determinações simultâneas e isoladas, respectivamente. Os resultados obtidos para ambos os

analitos foram de mesma magnitude ou menores aos encontrados na literatura [59,108-112].

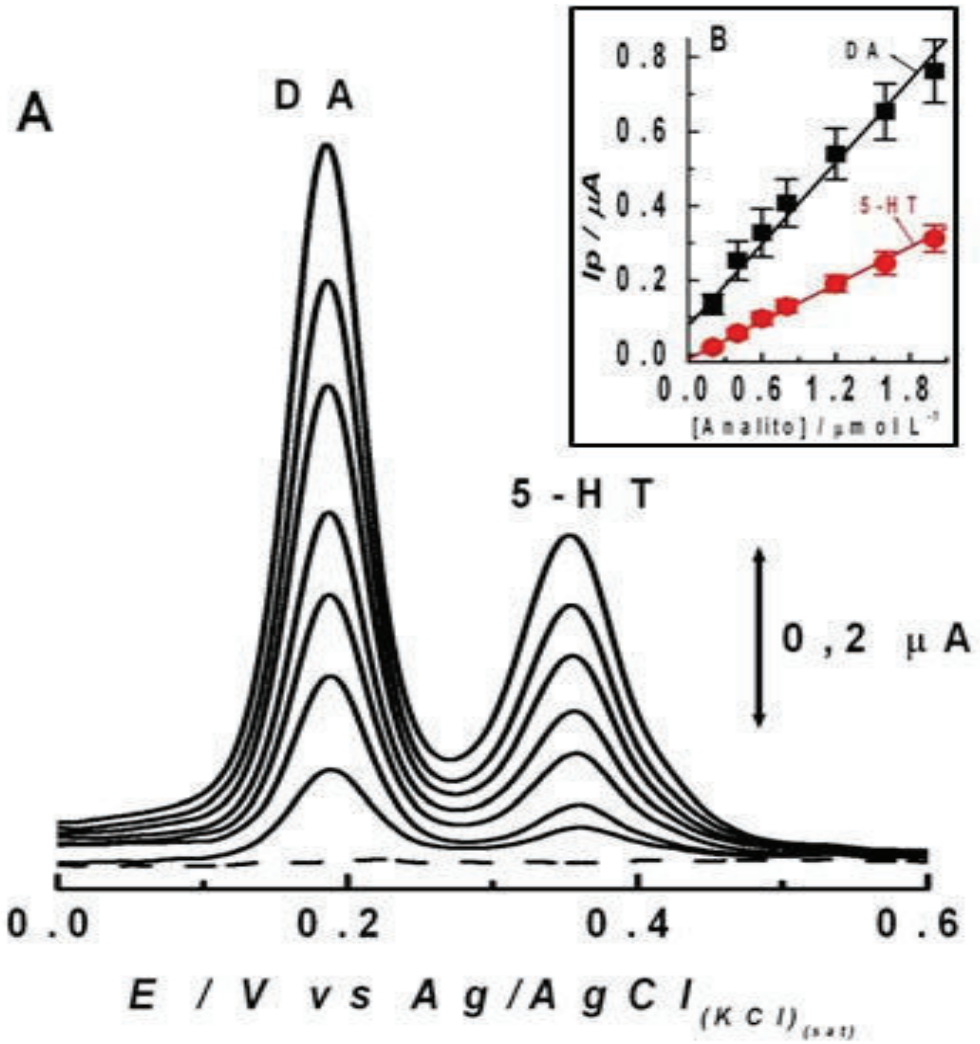


Figura 31. (A) V.P.D. obtidos com ECV-5HT em solução de DA e 5HT no intervalo de $2{,}0x10^{-7}$ a $2{,}0x10^{-6}$ mol L^{-1} em TF pH 6,5. E_i = 0,0 V; E_f = 0,6 V e tempo de pré-concentração a 1,5 V por 20 s, ν = 10,0 mV s^{-1}; amplitude de pulso = 50 mV; largura de pulso = 70 ms (**B)** Curva analitica simultânea obtida a partir dos valores de Ip_a vs [DA] e de Ip_a vs [5HT].

Interferentes encontrados no sistemas nervoso central como ácido ascórbico (AA), tirosina (Tyr) e seus derivados adrenérgicos, (DA, EP e NE) foram investigados por VPD por adição destes derivados em concentração mais elevadas em relação a concentração de 5-HT (1,0 x 10^{-5} mol L^{-1}). A **Tabela III**

apresenta os valores de Ep destes derivados, bem como a variação de potencial (ΔE) em relação a 5-HT. Pode-se inferir, pelos resultados apresentados na **Tabela III**, que seria possível realizar a determinação de baixas concentrações de 5-HT, em presença destes neurotransmissores ou AA, visto que a menor separação entre os picos foi de 130 mV.

Tabela III: Dados de potencias de pico (Ep) e diferença de potencial em relação a 5-HT (ΔE), de possíveis interferentes como: ácido ascórbico, neurotransmissores e seus precursores, obtidos por VPD em TF pH 6,5, E_i = -0,2 V; E_f = 0,9 V*.

Analitos	5-HT	AA	DA	EP	NE	Tyr	Trp
[Analito]** / μmol L^{-1}	10,0	500	20,0	20,0	20,0	50	50
Ep / mV	340	120	200	220	210	720	720
ΔE ($Ep_{5\text{-}HT}$-$Ep_{analito}$)	-220	140	160	150	130	380	380

* Demais condições vide figura 31 **Concentrações de medida

3.6 Modificação superficial de eletrodos de pasta de carbono em solução de Quercetina por filmes gerados eletroquimicamente

Flavonóides são grupos de compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza, muitos dos quais encontrados em frutas, verduras e uma variedade de bebidas (chá, café, vinho e sucos). A Quercetina é o flavonóide mais amplamente distribuído no reino vegetal, principalmente em maçãs, cebolas, chás e vinho tinto; é uma aglucona da rutina e de outros glicosídeos e possui uma poderosa atividade antioxidante [111-113]. Este flavonóide ainda possui atividade cardiovascular, anti-inflamatória, anti-

carcinogênica, anti-histamínicas, anti-viral, atua no sistema imunológico e reduz o efeito da formação de cataratas [114-116].

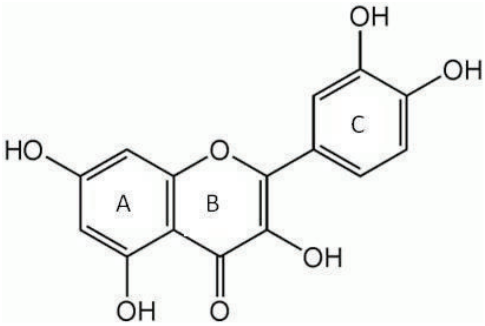


Figura 32: Estrutura molecular da Quercetina

Devido às suas propriedades quelante e sequestrante de radicais livres, uma série de estudos eletroquímicos têm sido conduzidos, principalmente os relativos à oxidação dos grupos hidroxila da molécula. Dentre estes, uma hidroxila no anel B e quatro nos anéis A e C (**Figura 32**) são eletroativos e o processo de oxidação ocorre sequencialmente, num mecanismo de cascata. Foram detectados três [117] ou quatro [118] picos de oxidação e um pico de redução, dependendo das condições experimentais empregadas. A hidroxila do anel B, representando um catecol, é a primeira a ser oxidada levando a formação da *o*-quinona da quercetina, num processo reversível envolvendo dois prótons e dois elétrons e responsável pelo único pico de redução observado no sentido catódico. A *o*-quinona formada neste processo é uma espécie eletroquimicamente ativa e instável, com um mecanismo do tipo eletroquímico-químico (EC) [117,118]. Os demais processos de oxidação são irreversíveis, ocorrem sequencialmente, em potenciais mais positivos e originam produtos que adsorvem fortemente à superfície do eletrodo. Os resultados obtidos por Zare *et al.* [119] mostraram que o comportamento eletroquímico de quercetina é fortemente dependente do pH da solução. Em toda a faixa de pH, o processo de eletro-oxidação de quercetina segue um mecanismo ECE e a o-quinona

derivada participa de reação de adição com quercetina produzindo um dímero, causando adsorção superficial em eletrodos.

Por esses motivos a determinação analítica da quercetina tem sido um grande desafio. Diversas estratégias de modificação de eletrodos, acopladas a utilização de técnicas voltamétricas, têm sido utilizadas visando à determinação de Quercetina com alta sensibilidade e sem efeitos de adsorção superficial [120, 121]. Dentre essas estratégias podem ser citadas a utilização de nanotubos de carbono de parede múltiplas, imobilizados com parafina, cola de colina e catalizador sobre eletrodos de grafite, com medidas voltamétricas realizadas por redissolução adsortiva [122], ou ainda a utilização de eletrodo de pasta de carbono não modificado, com renovação superficial constante, para determinação do analito por voltametria de onda quadrada com redissolução anódica [121].

No presente trabalho, avaliou-se a possibilidade da modificação superficial por filmes poliméricos formados pelos produtos de oxidação da quercetina em diversos substratos de carbono. O principal objetivo, nesta etapa de trabalho, foi comparar o filme formado em solução de quercetina, com os obtidos pela modificação realizada em DA e em 5-HT, comparar o desempenho destes filmes na imobilização de nanotubos de carbono ou comparar ainda o melhor filme na co-imobilização das bases nitrogenadas de DNA. Como os filmes poliméricos de quercetina não evitaram o envenenamento superficial buscou-se entender o mecanismo de oxidação da quercetina. A oxidação desta espécie foi feita em diversos substratos de carbono, sem a necessidade de renovação superficial, apenas com uma etapa de pré-concentração. O método

desenvolvido para quantificação de quercetina utilizando eletrodos de pasta de carbono, carbono vítreo, grafite pirolítico e diamante dopado com boro, apresentou alta sensibilidade, dispensou a necessidade de modificação ou renovação superficial, bastando para tanto restringir a janela de potencial ao primeiro pico de oxidação, evitando a adsorção dos produtos de oxidação das etapas subsequentes.

3.6.1 Modificação de eletrodos em solução de quercetina

O mesmo procedimento anterior foi utilizado nesta modificação. O eletrodo de trabalho previamente ativado foi transferido para a célula eletroquímica contendo os eletrodos de referência e auxiliar e o eletrólito suporte. Em seguida efetuou-se o registro de voltamogramas de pulso diferencial nas seguintes condições: $E_{inicial}$: -0,2 V, E_{final}: +0,5 V e v = 10 mV s^{-1}, até a estabilização da linha base, com etapas de pré-concentração de 10 s a +1,5 V. Após esta etapa adicionou-se a solução modificadora (Quercetina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) à célula, mantendo-se o potencial aplicado de + 1,5 V por 120 s, sob agitação. Esta foi a condição otimizada de modificação. Variações no processo de modificação foram realizadas e serão discutidas no momento oportuno.

Eletrodos de pasta de carbono sem qualquer modificação foram utilizados na determinação voltamétrica de solução de quercetina 1,0 µmol L^{-1}, em tampão fosfato pH 3,0. Os picos de oxidação de quercetina, apresentados na **Figura 33**, foram obtidos por voltametria de pulso diferencial (VPD). São mostrados o primeiro voltamograma de cada série. No voltamograma

apresentado na **Figura 33A,** houve pré-concentração à -0,3 V por 120 s, já o voltamograma apresentado na **Figura 33B** foi realizado imediatamente após o voltamograma apresentado em A, porém com pré-concentração à +1,5 V por 120s. Três picos foram detectados a +0,37, +0,48 e +0,70 V, os quais estão associados com a oxidação dos grupos hidroxilas da quercetina [118], um quarto pico de oxidação ainda poderia ser observado em regiões mais positivas de potencial. O primeiro pico apresenta reversibilidade, já os demais são irreversíveis e os produtos adsorvem fortemente na superfície do eletrodo [117,118]. Corroborando com os efeitos de envenenamento superficial descritos na literatura, o primeiro pico de oxidação da quercetina diminuiu drasticamente, cerca de 60% (**Figura 33B**), após pré-concentração em solução de quercetina a + 1,5 V durante dois minutos.

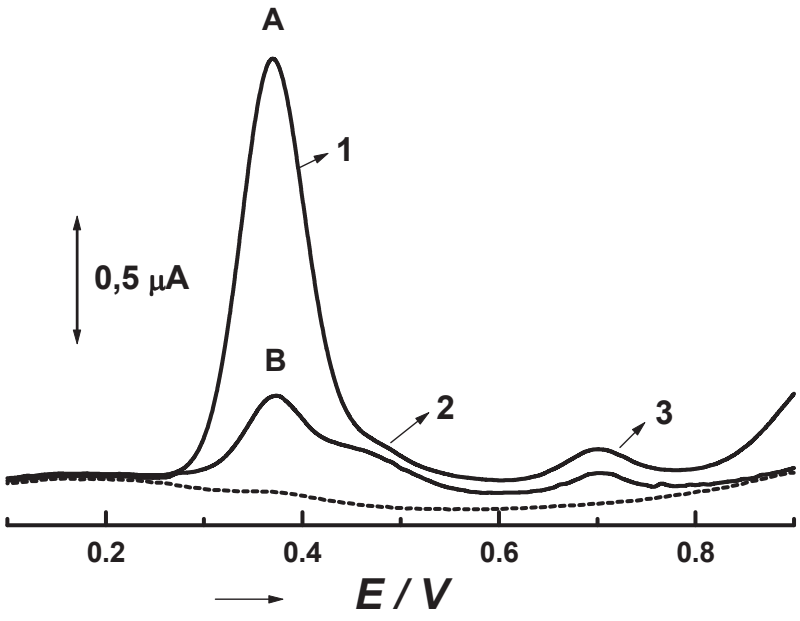


Figura 33. V.P.D. obtidos com eletrodo de pasta da carbono em: (----) solução de TF 0,1 mol L^{-1} pH 3,0, (—) solução de quercetina 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1} em TF 0,1 mol L^{-1}pH 3,0. A) Pré concentração à - 0,3 V por 120s; B) Pré concentração à + 1,5 V por 120 s. Condições Experimentais semelhante a da **Figura 31.**

Como os produtos de oxidação de quercetina possuem grupos quinônicos e estes devem ser os responsáveis pelo aumento de sensibilidade e formação do filme polimérico obtido em solução de dopamina [59], avaliou-se a possibilidade de realizar uma modificação semelhante com a superfície de carbono em solução de quercetina.

Assim como no processo de modificação em solução de Dopamina, utilizou-se o seguinte procedimento para modificação de eletrodos de pasta de carbono em solução de quercetina. O eletrodo inicialmente sofreu ativação da superfície em NaOH 0,1 mol L^{-1} pela aplicação de 1,5 V por 120 s, sob agitação. Em seguida, condicionamento em tampão fosfato no pH 10,0 pelo registro de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial (VPD) com pré-concentração de 10 s a 1,5 V, em condições idênticas as da modificação em dopamina, porém no intervalo de potencial -0,2 V a +0,5 V até estabilização da linha base. Por fim, na tentativa de obtenção superficial do filme aplicou-se 1,5 V por 120 s, sob agitação de solução de quercetina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

Após a modificação realizaram-se o registro de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial (VPD) em tampão fosfato em pH 7,0 até estabilização da linha base. Em seguida, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de quercetina, em condições experimentais idênticas às descritas na **Figura 31**. Os voltamogramas foram realizados em triplicatas e são apresentados na **Figura 34** o terceiro registrado para cada concentração.

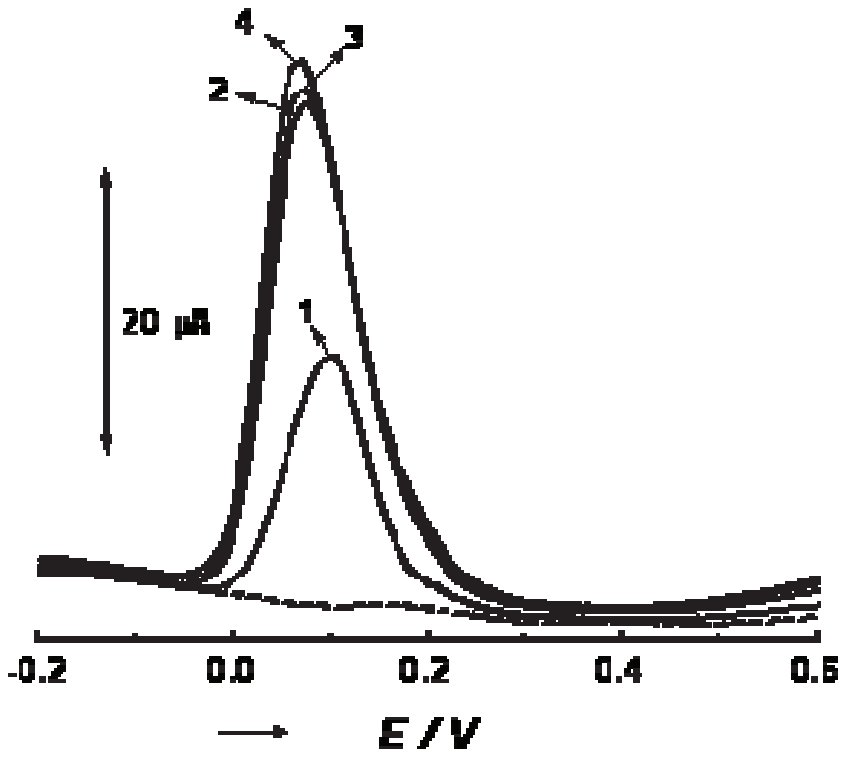


Figura 34. V.P.D. obtidos com eletrodo de pasta da carbono modificado em solução de quercetina: (----) solução TF 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, (—) solução de quecetina **(1)** 1,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, **(2)** 2,0 x 10^{-5} mol L^{-1}, **(3)** 3,0 x 10^{-5} mol L^{-1} **(4)** 4,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em TF 0,1 mol L^{-1}pH 3,0. Pré concentração à -0,3 V por 10s ;. Condições Experimentais vide **Figura 31**.

Os voltamogramas apresentados na **Figura 34**, mostram que com o aumento da concentração de quercetina não houve aumento proporcional de corrente, sendo um indicativo que não houve formação de um filme polimérico que impedisse a adsorção dos produtos de oxidação da quercetina na superfície do eletrodo. Eletrodos que receberam o mesmo tratamento ainda foram testados em solução de quercetina variando-se o pH da solução tampão ou ainda variando a composição do tampão, porém não houve melhoria nos resultados. Além do tampão fosfato que apresentou os melhores resultados foram utilizados como eletrólito suporte tampão universal, ou solução de cloreto de potássio.

A **Figura 35** apresenta os voltamogramas obtidos com eletrodos de pasta de carbono modificados em solução de quercetina, na detecção de dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,0 (**voltamograma 1**), e na detecção simultaneamente de Ácido Ascórbico 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, Dopamina 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e Ácido Úrico 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,0, **(voltamograma 2)**. Com o eletrodo modificado em quercetina não foi possível discriminar os picos de oxidação para os três analitos, sendo possível apenas observar dois picos de oxidação sobrepostos. Com estes resultados pode-se afirmar com segurança que não foi possível obter um filme polimérico como aqueles obtidos com eletrodos em solução de dopamina ou serotonina. Foram ainda realizadas tentativas de obtenção de um filme polimérico de quercetina em outros substratos de carbono, porém os resultados foram semelhantes aos apresentados na **Figura 35**.

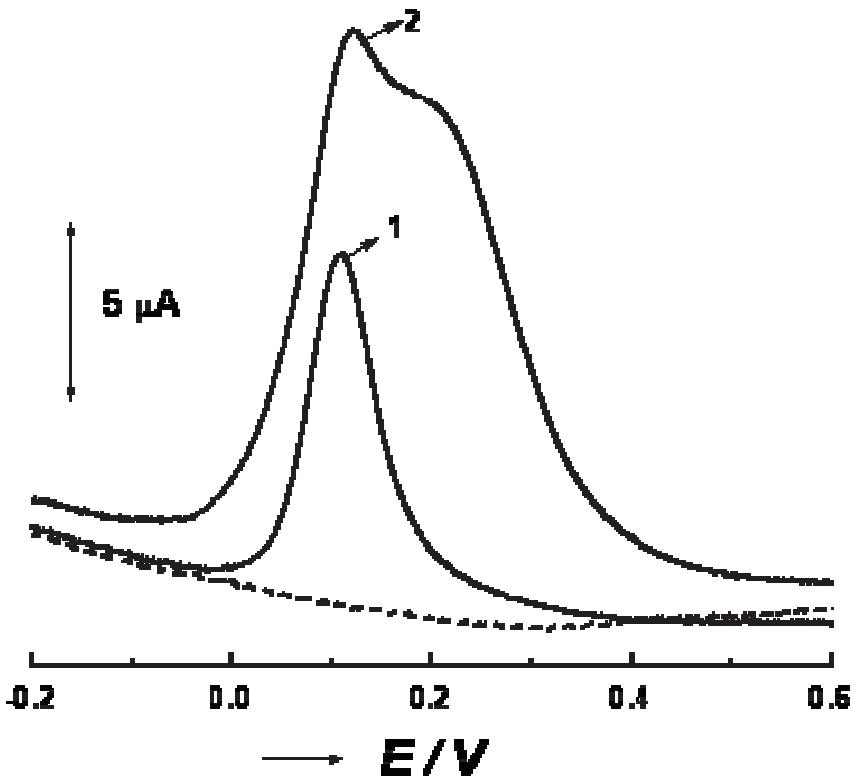


Figura 35 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em TF pH 7.0 (·····) e apresentado em linha sólida **(—), (1)** solução contendo Dopamina (DA) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato pH 6,5 e **(2)** solução contendo simultaneamente ácido ascórbico (AA) 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; (DA) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e ácido úrico (AU) 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1}**,** com eletrodo modificado em quercetina. Demais condições ver **Figura 31.**

3.7. Determinação Analítica de Quercetina em Eletrodos de Carbono não Modificados

Como descrito na literatura, no processo de oxidação da quercetina, o mecanismo ocorre num processo em cascata, onde o primeiro pico apresenta reversibilidade, já os demais são irreversíveis e os produtos adsorvem fortemente na superfície do eletrodo [118,119,122]. Assim, avaliou-se a possibibilidade de se determinar quercetina utilizando-se o primeiro pico de

oxidação. Para tanto, a varredura foi efetuada em uma janela restrita de potencial, evitando-se que houvesse a formação dos produtos de oxidação subsequentes. Este procedimento foi realizado em diferentes substratos de carbono.

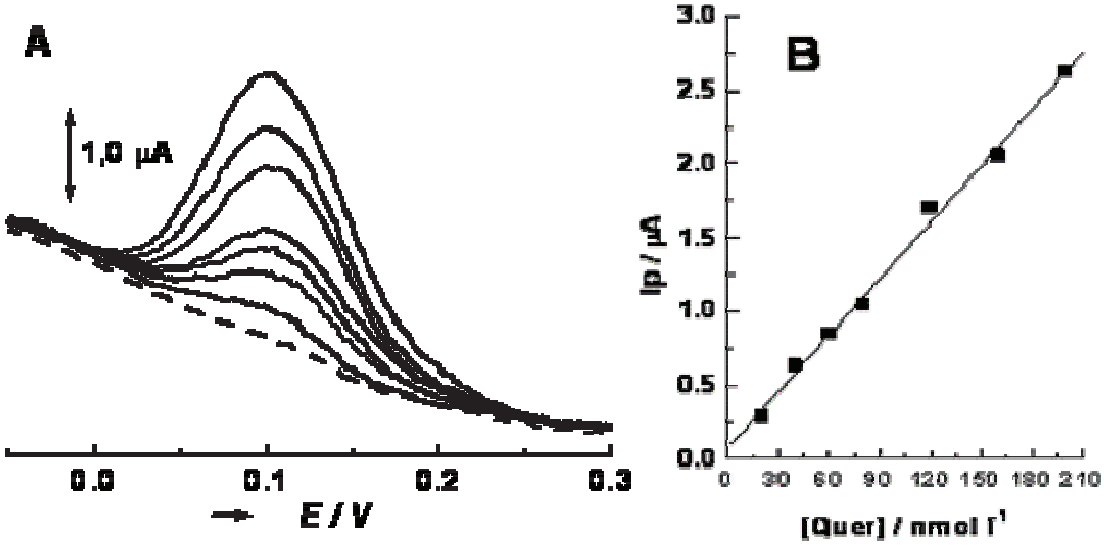


Figura 36. (A) V.P.D. obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução quercetina no intervalo de $2{,}0x10^{-8}$ a $2{,}0x10^{-7}$ mol L^{-1} em TF pH 7,0. E_i = - 0,3 V; E_f = + 0,3 V e tempo de pré-concentração de 10s à - 0,3 V. Demais condições *vide* Fig 1. (**B)** Curva analitica. Demais condições ver **Figura 31.**

VPD, em triplicata, foram obtidos em solução de quercetina com eletrodos de pasta de carbono, carbono vítreo, grafite pirolítico e diamante dopado com boro e os dados utilizados na construção de curvas analíticas. A **Figura 36A** apresenta os VPD obtidos com eletrodo de carbono vítreo em soluções contendo concentrações de quercetina no intervalo de 2,0 x 10^{-8} à 2,0 x 10^{-7} mol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,0. O valor mediano de corrente foi usado na construção da curva analítica, **Figura 36B**. Observou-se que para baixas concentrações de quercetina houve apenas uma pequena variação

aleatória do potencial de pico (**ΔE = 9,0 mV**), porém a corrente de pico aumentou proporcionalmente com a concentração do analito, de modo que o efeito de envenamento superficial foi descartado. Resultados semelhantes foram obtidos para os demais eletrodos utilizados. Os limites de detecção variaram de 5,1 – 16,2 x 10^{-9} mol L^{-1}, valores estes semelhantes aos encontrados na literatura [122] ou ainda mais baixos [121], **Tabela IV**.

Tabela IV: Parâmetros analíticos obtidos em solução de quercetina com os diferentes tipos de eletrodo de carbono.

Eletrodo	Faixa Linear (mol L^{-1} x 10^{-8})	ΔEp (mV)	R^2	Sensibilidade* (A mol^{-1} L cm^{-2})	Lim. de Detecção (mol L^{-1} x 10^{-9})
ECV	2,00 – 20,0	103 – 112	0,995	16,3 ± 0,5	11,0 ± 0,4
EDDB	2,00 – 20,0	97 – 102	0,999	4,20 ± 0,07	5,36 ± 0,02
EPC.	2,00 – 12,0	96 – 103	0,998	6,7 ± 0,2	5,1 ± 0,1
EGP.	12,0 – 44,0	93 – 99	0,999	10,6 ± 0,2	16,2 ± 0,3

*Calculada usando as áreas geométricas: 0,78, 0,28, 0,50 e 0,78 cm^2, respectivamente.

3.8 Síntese e caracterização do complexo Cobre-neocuproína

Como neste trabalho existiam dois grandes objetivos, nomeadamente o desenvolvimento de superfícies modificadas para a imobilização das bases do ácido desoxiribonucleico (DNA) ou do próprio DNA, e o estudo de interação destas macromoléculas com espécies de interesse clínico e ambiental, foi sintetizado o complexo de cobre (II) com neocuproína, a ser posteriormente utilizado como precursor da formação de radicais livres.

A neocuproína **(Figura 37a)** ou 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (NC) é um composto heterocíclico derivado da fenantrolina de fórmula bruta $C_{14}H_{12}N_2$ (MM = 208,26 g mol^{-1}). Na temperatura ambiente é um sólido de coloração amarelo-pálido pouco solúvel em pH > 7,0 **(Figura 37b)** [123].

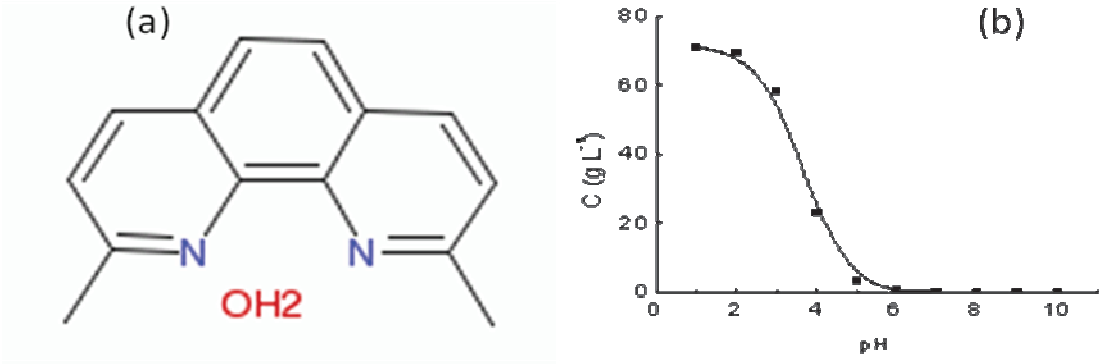


Figura 37: a) Estrutura da neocuproína hidratada; b) curva de solubilidade em função do pH.

Íons Cu^{2+} em solução aquosa formam lentamente com a neocuproína com a neocuproína um complexo quadrado planar estável de coloração laranja (ε_{454nm} = 3550 M^{-1} cm^{-1}) com estequiometria 1:2 metal:ligante (log β_2 = 11.4) [124].

Na presença de certos redutores, o Cu^{2+} é reduzido a Cu^{+} formando um complexo tetraédrico de cor laranja mais intensa (ε_{454nm} = 7950 $M^{-1}cm^{-1}$) de fórmula $Cu(NC)_2^{1+}$ (log β2 = 19.1) [124]. Este íon complexo é estável por longos períodos de tempo numa ampla faixa de pH [124,125]. Contudo a absorbância de $Cu(NC)_2^{1+}$ decresce drasticamente na presença de íons Cu^{2+} devido à formação de uma mistura de complexos, com estrutura ou geometria de ligação diferentes, quando a neocuproína não se encontra em excesso em solução [124].

Shtoyko *et al*. [126] utilizaram a técnica da espectroeletroquímica para demonstrar que $Cu(NC)_2^{2+}$ pode ser reduzido a $Cu(NC)_2^{1+}$, sendo possível a formação de Cu^0 mesmo na presença de excesso de NC. Além de formar um complexo muito estável com Cu^{1+}, NC forma também complexos com outros íons metálicos, como Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e $Cd^{2+,}$ porém, as respectivas constantes de equilíbrio são bem menores do que a do complexo com Cu^+ [124]. Estudos realizados com DNA demonstraram que a NC é capaz de inibir a degradação do DNA em linfócitos intactos, bem como em seus núcleos [127]. Diversos complexos de cobre podem promover lesões oxidativas ao DNA. A reação de clivagem do DNA é, na maioria das vezes, mediada por espécies reativas de oxigênio, que são produzidas, por exemplo, durante o processo de redução de Cu (II) para Cu (I), nos complexos metálicos como posterior formação de radicais hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio, responsável pela ruptura da estrutura heliocoidal do DNA [127-131]. A clivagem pode ainda ser induzida diretamente por cobre (III) sem a necessidade de um agente ativo [132].

A neocuproína é usada com um reagente clínico em testes de glicemia com determinação espectrofotométrica [133]. Recentemente, Moya *et al.* utilizaram os complexos de Cu(II)/NC [134] na determinação de polifenóis totais em amostras de vinho. No referido trabalho, a solução de neocuproína foi preparada em tampão de acetato de amônio 0,18 mol L^{-1}, porém quando o reagente foi preparado na ausência de tampão, e na presença de perclorato de cobre (II), observou-se a formação de um precipitado verde esmeralda, o que pode ser indício da formação de um complexo de neocuproína cobre formando um sal insolúvel com íons perclorato.

Como estratégia neste trabalho realizou-se a síntese do material precipitando íons cobre com neocuproína.

Na tentativa de sintetizar o precipitado observado por Moya *et al.* [134], perclorato de cobre II foi preparado em solução tampão de acetato de amônio 0,2 M e solução de cloridrato de neocuproína, 0,2 M, em água e, estas soluções foram misturadas nas seguintes proporções: 1:1, 2:1 e 3:1 (v/v). Diferentemente do observado por Moya *et al.*, em todos os casos, não houve formação de qualquer precipitado.

O mesmo procedimento foi repetido, mas desta vez com a solução de perclorato de cobre em água, porém não houve precipitação do sal complexo. Na tentativa de sintetizar o complexo os seguintes parâmetros foram alterados: composição do tampão, variação do pH de síntese, variação do contra íon do sal de cobre, variação da temperatura, estado de oxidação e variação da concentração do sal de cobre e de neocuproína. Posteriormente, soluções de perclorato de cobre II 2,0 x 10^{-3} mol L^{-1} foram preparadas em tampão fosfato, tampão PIPES, tampão citrato e tampão universal todos 0,2, mol L^{-1}em pH 7,0, repetindo-se o procedimento de síntese. Em todos os casos não houve formação de precipitado. Neste mesmo pH, ainda foram testados outros sais de cobre II como sulfato e nitrato, obtendo-se os mesmos resultados.

Normalmente a solução de neocuproína é preparada em tampão acetato de amônio. Neste caso em particular, a solução foi preparada em água e misturada a uma solução de $Cu(ClO_4)_2$, preparada em tampão acetato de amônio.

O próximo passo foi então a tentativa de sintetizar o complexo em valores mais baixos de pH como 3,0 e 4,5, utilizando para tanto tampões universal, acetato, fosfato e citrato e mantendo os íons perclorato, sulfato e nitrato de cobre II, como reagentes de partida. Conforme observado anteriormente não houve a precipitação do sal complexo em nenhum dos casos.

A síntese foi ainda avaliada em tampão universal pH 3,0, a temperatura de 0 ^{0}C (banho de gelo) e 100 ^{0}C (banho-maria), porém em nenhum dos casos observou-se a formação do complexo. A utilização de cloreto de cobre I e nitrato de cobre II na presença de um agente redutor, não também não surtiu efeito.

Por fim, resolveu-se testar soluções mais concentradas dos reagentes de partida. Deste modo, a síntese foi repetida utilizando as soluções preparadas nas seguintes concentrações: cloridrato de neocuproína 0,1 mol L^{-1} e de nitrato de cobre II 1,0 mol L^{-1}, ambos em água. As soluções foram misturadas nas seguintes proporções 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v), em todos os casos houve formação de um precipitado verde esmeralda.

As amostras foram então centrifugadas, observando-se que a cor do sobrenadante variou de forma gradual de ligeiramente azul, para azul mais intenso, ou seja, de leve coloração na menor proporção (1:1, v:v), para o azul característico da solução de nitrato de cobre II (3:1, v:v) indicativo de excesso de Cu (II). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água e novamente centrifugado. Esta operação foi repetida mais uma vez. Após a primeira lavagem, o sobrenadante tornou-se verde, ou seja, com a mesma coloração do precipitado.

Após a segunda lavagem, o precipitado foi transferido para uma cápsula de porcelana e mantido em estufa por 12 h a 100 ^{0}C. Em seguida, o material foi transferido para um recipiente e mantido em dessecador por 24 h à temperatura ambiente e encaminhado para caracterização.

Finalmente, a melhor condição obtida para este procedimento na síntese do composto, foi a solução de cloridrato de neocuproína 0,1 M e solução de nitrato de cobre (II) 1,0 M, ambas preparadas em água, na proporção de 1:1 (v/v).

Desde as últimas décadas, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) vem sendo amplamente utilizada na determinação de propriedades termodinâmicas de diversas substâncias orgânicas puras [135-138]. Muitas destas propriedades como a capacidade calorífica, entalpias de vaporização e sublimação podem ser determinadas a 25 ºC, ou em temperaturas superiores usando amostras sólidas ou mesmo soluções. Esta técnica tem, portanto, importância no campo da química, bioquímica e biofísica.

Para caracterização deste material utilizou-se técnicas de análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho (IR), e análise química elementar.

A caracterização do complexo foi realizada por meio de curvas termogravimétrica (TG/DTG) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC). O teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio no sal complexo foi determinado por meio de análise elementar, enquanto o teor de cobre foi determinado por absorção atômica. Empregou-se ainda a espectrometria na região do

infravermelho, buscando confirmar a estrutura e composição proposta para o composto.

A determinação do cobre presente no complexo Cobre- neocuproína foi realizada por espectrometria de absorção atômica. A **Figura 38** mostra a curva de calibração para determinação da percentagem de cobre presente no complexo. Para a construção desta curva analítica foram preparadas soluções de cobre na faixa de 2,0 a 12,0 mg/L em solução de acetonitrina 4% (v/v). As soluções de cobre (II) foram devidamente padronizadas. Para solubilização do composto sintetizado de Cu-neocuproína $[Cu(NC)_n]^{n+}$ utilizou-se acetonitrila. A solução foi posteriormente diluída a 4% (acetonitrila/H_2O, v/v).

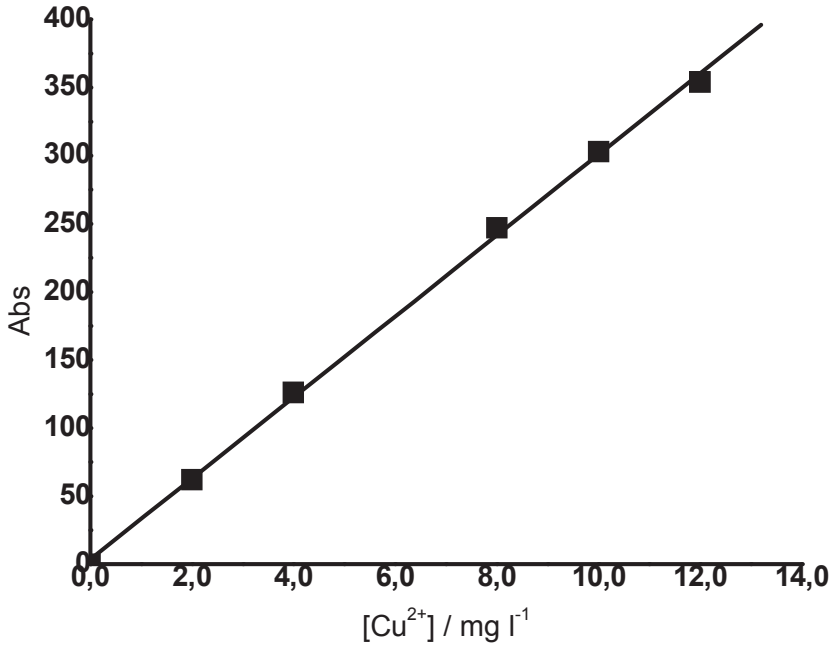


Figura 38. – Curva analítica obtida usando Espectrometria de Absorção Atômica, com padrões de 2,0-12,0 ppm de Cu^{2+} em solução de acetonitrina 4% (v/v) em H_2O.

A **figura 38** apresenta a curva analítica obtida com as soluções de cobre, houve um aumento linear da absorção como função do aumento da concentração das soluções de cobre, obedecendo a seguinte equação **Abs / unidades arbitrárias = 3,6 ± 3,5 + 29,7± 0,4 [Cu^{2+}].** Esta curva analítica foi utilizada na determinação de Cobre nas soluções dos reagentes empregados para a síntese do complexo e na solução proveniente do sal complexo. Para a solução de cloridrato de neocuproína 1,2 g L^{-1}, a absorbância registrada foi de 1,0 unidade de absrbância, ou seja, não foi detectada a presença de íons cobre na amostra. Já para o composto Cobre-neocuproína 0,11 g L^{-1}, a absorbância registrada foi de 288 unidades, que correspondea concentração de Cobre igual a 9,6 mg L^{-1}. Dessa maneira, o resultado obtido por absorção atômica corresponde à percentagem de cobre, no composto sintetizado, foi de 8,7%.

A determinação da percentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio para a amostra de cloridrato de neocuproína foi realizada por análise elementar na Central Analítica do IQ/USP e os resultados obtidos foram comparados aos resultados teoricamente previstos para ($C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl$). Com este ensaio foi possível propor o número de moléculas de água presentes na amostra. A **Tabela V** apresenta estes resultados:

Tabela V. Comparação entre os resultados experimentais obtidos por análise elementar e os teóricos para amostra de neocuproína.

	Experimental		**Teórico**		**Desvio**	
	%	N^0	%	N^0	%	N^0
Carbono	56,82	13,4	68,71	14	-11,89	- 0,6
Hidrogênio	6,56	18,3	4,94	13	1,62	5,3
Nitrogênio	10,01	2	11,45	2	-1,44	0

A comparação entre os resultados experimentais e os teoricamente previstos diferem bastante, pois o resultado teórico não previu a incorporação de água de umidade ou de cristalização. Com estes resultados foi possível propor o número de três moléculas de água presentes na amostra, pois o hidrogênio foi o único elemento que sofreu um desvio positivo. Levando em consideração três moléculas de H_2O foi construída a **Tabela VI**.

Tabela VI. Comparação entre os resultados experimentais obtidos por análise elementar e os teóricos para amostra de cloridrato de neocuproína hidratado.

	Experimental		**Teórico**		**Desvio**	
	% em massa	N^0 Atomos	% em massa	N^0 Atomos	% em massa	N^0 Atomos
Carbono	56,82	13,4	56,28	14	+ 0,54	- 0,6
Hidrogênio	6,56	18,3	6,41	19	+ 0,15	- 0,7
Nitrogênio	10,01	2	11,45	2	- 1,44	0
Oxigênio	26,61*	---	16,06	3	- 1,31	---
Cloro	---	---	11,86	1	---	---

*valor obtido por diferença.

Os resultados experimentais foram bem próximos dos calculados teoricamente, levando em consideração que, para cada molécula de neocuproína há três moléculas de água. No entanto, estes resultados só poderiam ser confirmados com os resultados do estudo termoanalítico, cujos resultados estão apresentados adiante.

O mesmo procedimento adotado para a caracterização do cloridrato de neocuproína foi utilizado para o composto sintetizado. Diversas simulações foram realizadas para que se pudesse propor a composição do complexo obtido. A **Tabela VII** sumariza os o valores obtidos por análise elementar, além de acrescentar os resultados obtidos por espectroscopia de absorção atômica

para a determinação da percentagem de Cobre presente no composto e traz ainda, os valores estimados para composição do sal formado, bem como o possível número de moléculas de hidratação.

Tabela VII. Comparação entre os resultados experimentais obtidos por análise elementar e os teóricos para amostra de Cobre-neocuproína

	Experimental		**Teórico**		**Desvio**	
	%	N^0	%	N^0	%	N^0
Cobre*	8,71	1,0	9,41	1	- 0,70	0,0
Carbono	51,64	32,4	48,28	28	+ 3,36	+ 4,4
Hidrogênio	4,70	35,1	4,49	34	+ 0,21	+ 1,1
Nitrogênio	11,47	6,2	12,06	6	- 0,59	+ 0,2
Oxigênio	23,48**	11,0	25,28	11	1,80	0,0

*valor obtido por Absorção atômica, **valor obtido por diferença.

A partir dos dados apresentados na **Tabela VII**, para cada elemento pode-se propor que a molécula do composto sintetizado possui a seguinte composição: $[\mathbf{Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2}]^{2+}\ \mathbf{2(NO_3^-)\cdot 5H_2O}$, ou seja, um átomo de Cobre II complexado com duas moléculas de neocuproína, dois íons nitrato ligados ao complexo formado e ainda, cinco moléculas de água, que podem ser de água fisiossorvida ou de cristalização. Os valores obtidos experimentalmente para cada elemento, comparados com os propostos teoricamente estão, em geral, muito próximos, com exceção do carbono.

Estes resultados serão avaliados com maior rigor através dos resultados obtidos empregando as técnicas termoanalíticas.

A **Figura 39** apresenta as curvas obtidas pelos ensaios realizados em TG (cadinho de platina, sem tampa, contendo 14,6 mg de neocuproína) e DSC (panela de alumínio com tampa, contendo 1,81 mg de neocuproína) de

amostras do composto orgânico complexante neocuproína (2,9-dimetil 1,10-fenantrolina), sob a forma do sal cloridrato de neocuproína ($C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl$).

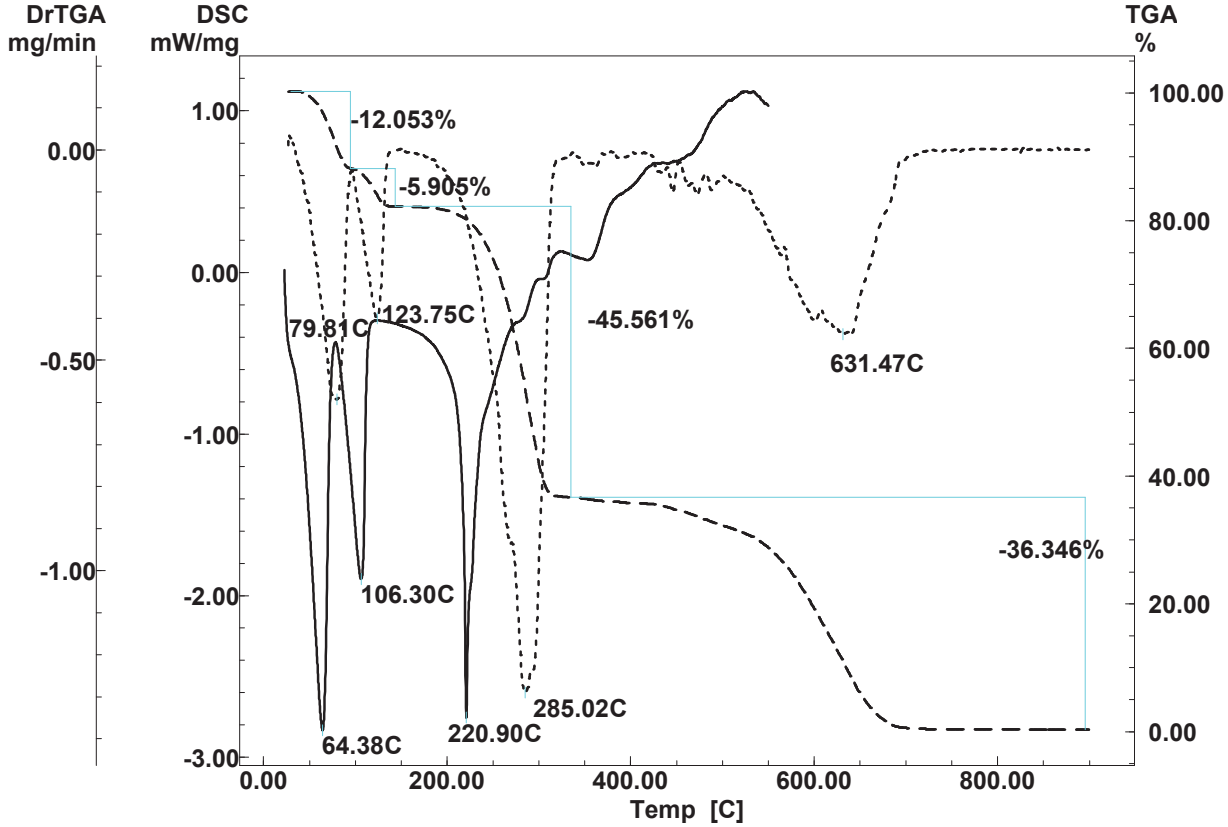


Figura 39 – Curvas de TG (----), DTG (·····) e DSC (—) de uma amostra de cloridrato de neocuproína, em atmosfera de ar e vazão de 50 cm^3 min^{-1}, sob taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}. Análise DSC, em atmosfera de nitrogênio sob vazão de 100 cm^3 min^{-1} e taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}. No DSC o pico endotémico é para baixo.

A **Figura 39** ilustra a ocorrência de eventos de perda de massa na curva do ensaio em TG em temperaturas correspondentes a eventos endotérmicos ocorridos na curva do ensaio em DSC.

O primeiro evento endotérmico observado na curva de DSC, com temperatura de pico (**Tp**) de 64 ºC; ocorre em temperatura muito próxima ao

primeiro evento de perda de massa, mostrado na curva de TG, com valor de temperatura em que se inicia o evento extrapolado de perda de massa (temperatura *onset*) de 64 ºC, e temperatura de pico (**Tp**) obtida na curva de DTG de 80 ºC.

Este evento é observado na curva de TG com valor de perda de massa de 12%. Devido a estabilidade térmica da molécula de neocuproína, a qual apresenta ponto de fusão bem definido em torno de 230 ºC, tal processo de perda de massa foi atribuído a perda de moléculas de água, contidas no reagente, como por exemplo, água de hidratação ou fisiossorvida.

O segundo evento endotérmico apresentado na curva DSC, da mesma forma como observado no primeiro processo, coincide com o segundo processo de perda de massa observado na curva de TG. Isto é concluído porque a temperatura de pico da curva de DSC tem valor de 106 ºC, valor idêntico à temperatura *onset* obtida do segundo processo de perda de massa da curva de TG (106 ºC). A curva de DTG apresenta o segundo pico com valor de Tp = 124 ºC.

Tal processo também é caracterizado como uma segunda perda de massa relacionada com a saída de moléculas de água, porém, as moléculas que saíram no segundo processo estão mais fortemente ligadas à molécula de neocuproína, neste caso, provavelmente, tratando-se de água de cristalização.

Desta forma, os dois primeiros processos ocorridos com a molécula da amostra seguem o esquema:

$$C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}(x + y)\ H_2O \rightarrow C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}x\ H_2O + y\ H_2O$$

(primeira perda de massa)

$$C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}x\ H_2O \rightarrow C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl + x\ H_2O$$

(segunda perda de massa)

$y\ M(H_2O)$	=	12,053%
$x\ M(H_2O)$	=	5,905%
$(x + y)\ M(H_2O)$	=	17,958%

$M(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}(x + y)\ H_2O)$	➔	100%
$M(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl)$	➔	(100 - 17,958)% = 82,015%

Como a massa de cloridrato de neocuproína é de 244,45 g/mol, chega-se à seguinte conclusão:

$MM(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}(x + y)\ H_2O)$	➔	100%
$244{,}45\ g\ mol^{-1}$	➔	82,015%

Assim, a massa molecular do cloridrato de neocuproína hidratada é de $MM(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}(x + y)\ H_2O) = 298{,}765\ g\ mol^{-1}$. Com este dado é possível

calcular a massa de água perdida em cada um dos eventos da curvas termogravimétricas.

$$\mathbf{MM(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}(x + y)\ H_2O) \rightarrow 298{,}765\ g\ mol^{-1} \quad \text{——} \quad 100\%}$$

$$\mathbf{\rightarrow y\ M(H_2O) \quad \text{——} \quad 12{,}053\%}$$

A massa perdida no primeiro evento foi y MM(H_2O) = 36,01 g mol^{-1}, ou seja, 18 y = 35,92, logo **y = 2,** o primeiro evento corresponde, portanto, à perda de duas moléculas de água.

Da mesma forma que foi calculada a perda de massa para o primeiro evento, calculou-se a perda de massa para o segundo evento:

$$\mathbf{MM(C_{14}H_{12}N_2\ .\ HCl\ .\ (x + 2)\ H_2O) \rightarrow 100\%}$$

$$\mathbf{x\ M(H_2O) \rightarrow 5{,}905\%}$$

$$\mathbf{x\ M(H_2O) = 17{,}96\ g\ mol^{-1}}$$

logo, o número moléculas de H_2O pedida no segundo evento corresponde a uma molécula **(x = 1).**

Dessa maneira, os processos ocorridos nos dois primeiros eventos das curvas TG e DSC são caracterizados como:

$$\mathbf{C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}3\ H_2O \rightarrow C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}H_2O + 2\ H_2O \qquad (1)}$$

$$\mathbf{C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}H_2O \rightarrow C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl + H_2O \qquad (2)}$$

O terceiro processo de perda de massa observado na curva de TG, o qual corresponde a perda de 45%, ocorreu em uma temperatura *onset* de 280 °C, valor muito próximo ao terceiro processo endotérmico observado na curva de DSC, com uma temperatura de pico de 221 °C.

O processo endotérmico ocorrido na curva de DSC, correspondente a Tp = 221 °C, e é caracterizado como a fusão do material, pois apresenta valor muito próximo à temperatura de fusão da neocuproína 250 ºC.

A molécula de cloridrato de neocuproína apresenta características iônicas devido à presença de moléculas de Ácido Clorídrico (HCl) em sua estrutura, formando o cloridrato. A saída de uma molécula de HCl da estrutura de cloridrato de neocuproína, fará com que essa se transforme em neocuproína sob a forma molecular e com isso as interações intermoleculares resultantes na molécula serão de baixa natureza dipolar — devido à presença dos grupos aromáticos com natureza apolar presentes na estrutura da neocuproína. Desta forma, a diminuição das interações intermoleculares favorece a fusão da substância.

Com isso, a saída de uma molécula de HCl facilita sequencialmente a fusão do material. Observa-se na curva de DTG que o pico de perda de massa em Tp = 285 ºC possui um pico, de modo que, talvez, seja consequência da perda de massa, ocorrendo em mais de um processo. É possível que, se este experimento fosse refeito utilizando taxa de aquecimento menor, este processo de perda de massa, correspondente a 45,5%, se desdobrasse em mais de um evento.

A análise das próximas porcentagens de perda de massa, comparadas à massa molecular do composto após a perda de água (82%), indica que a perda de 45,5%, pode se tratar da soma das massas da perda uma molécula de HCl do cloridrato de neocuproína no início da fusão do material, somada à % de perda de massa relativa a saída de átomos de carbono resultantes da decomposição do material que acabou de fundir-se em contato com a atmosfera do ar, formando dióxido de carbono (CO_2). Isto é passível de acontecer, devido à alta temperatura do material fundido (T > 200 ºC) e a alta reatividade do oxigênio (O_2), presente no ar.

Assim, o terceiro processo de perda de massa pode ser descrito segundo o seguinte esquema:

$$\mathbf{C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl \rightarrow C_{14}H_{12}N_2 + HCl}$$

$$\mathbf{MM(C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl) \rightarrow 82{,}015\%}$$

$$\mathbf{MM(HCl) \rightarrow \%(HCl)}$$

$$\mathbf{244{,}72\ g\ mol^{-1} \rightarrow 82{,}015\%}$$

$$\mathbf{36{,}45\ g\ mol^{-1} \rightarrow \%(HCl)}$$

$$\mathbf{\%(HCl) = 12{,}22\%}$$

Desta forma a perda de massa total do terceiro evento foi de 45,5% e a perda de HCl representa 12%. Logo a perda de massa responsável pelos átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, representa 33% do terceiro evento de composição térmica. Como a massa da neocuproína proposta é **MM($C_{14}H_{12}N_2$·HCl·3 H_2O) = 298,765 g mol^{-1}**, logo, a perda destes três componentes representa perda de massa de **99,61 g / mol**. Revelando-se então, que há degradação da molécula com a perda dos 2 nitrogênios, 12 hidrogênios e ainda 5 carbonos da molécula, sendo estes carbonos pertencentes provavelmente aos anéis piridínicos, resultando no esquema abaixo:

$$C_{14}H_{12}N_2 + (z + k + w/2)\ O_2 \rightarrow C_{14-z}H_{12-2w}N_{2-k} + z\ CO_2 + k\ NO_2 + w\ H_2O$$

onde z, k e w são as quantidades de oxigênio que oxidam respectivamente com os átomos de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio da molécula de neocuproína.

Sabendo que o terceiro evento de perda de massa está relacionada a perda de HCl (12%), ocorrendo simultaneamente a etapa final da decomposição térmica da molécula de neocuproína, com a perda de massa representando 33%, responsável pela perda de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio a qual ocorreu completamente gerando produtos voláteis, respectivamente na forma $5CO_2$, $6H_2O$ e $2NO_2$, de onde se pode fazer as seguintes relações:

$$C_{14}H_{12}N_2 + 10\ O_2 \rightarrow 9\ C + 5\ CO_2 + 2\ NO_2 + 6\ H_2O$$

(etapa final)

Assim a massa perdida de hidrogênio, carbono e nitrogênio (12 H + 5 C + 2 N) = 100 g / mol, muito próximo do calculado, que foi 99,61.

Já o quarto e último evento, também endotérmico, ocorreram com uma perda de massa de 36%, e só pode estar relacionado aos nove átomos de Carbono que restaram da molécula como resíduo. Assim, como a massa da neocuproína é **MM($C_{14}H_{12}N_2 \cdot HCl \cdot 3\ H_2O$) = 298,765 g mol^{-1}**, a perda de massa de Carbono seria 298,765 vezes 0,3635 = 108,60 g / mol, dividindo pela massa de Carbono (12,011), obtém-se o valor de 9,04 átomos, ou seja, os nove carbonos restantes.

Os dois últimos processos de perda de massa estão associados, portanto, à decomposição da molécula de neocuproína tal qual segue abaixo:

$$C_{14}H_{12}N_2 + 10\ O_2 \rightarrow 9\ C + 5\ CO_2 + 2\ NO_2 + 6\ H_2O$$

$$9\ C + 9\ O_2 \rightarrow 9\ CO_2$$

Estes resultados obtidos pela análise térmica corroboram com aqueles obtidos pela análise elementar e os valores calculados teoricamente para água de hidratação presentes na molécula também se confirmaram. Porém, para cada molécula de Cloridrato de neocuproína está presente apenas uma

molécula de água de cristalização, as outras duas são água de hidratação contidas na molécula **($C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl{\cdot}H_2O){\cdot}2H_2O$**.

A **Figura 40** apresenta as curvas obtidas pelos ensaios realizados em TG /DTG e DSC em amostras do composto sintetizado com o sal Cloridrato de neocuproína ($C_{14}H_{12}N_2{\cdot}HCl$) e Nitrato de cobre (II).

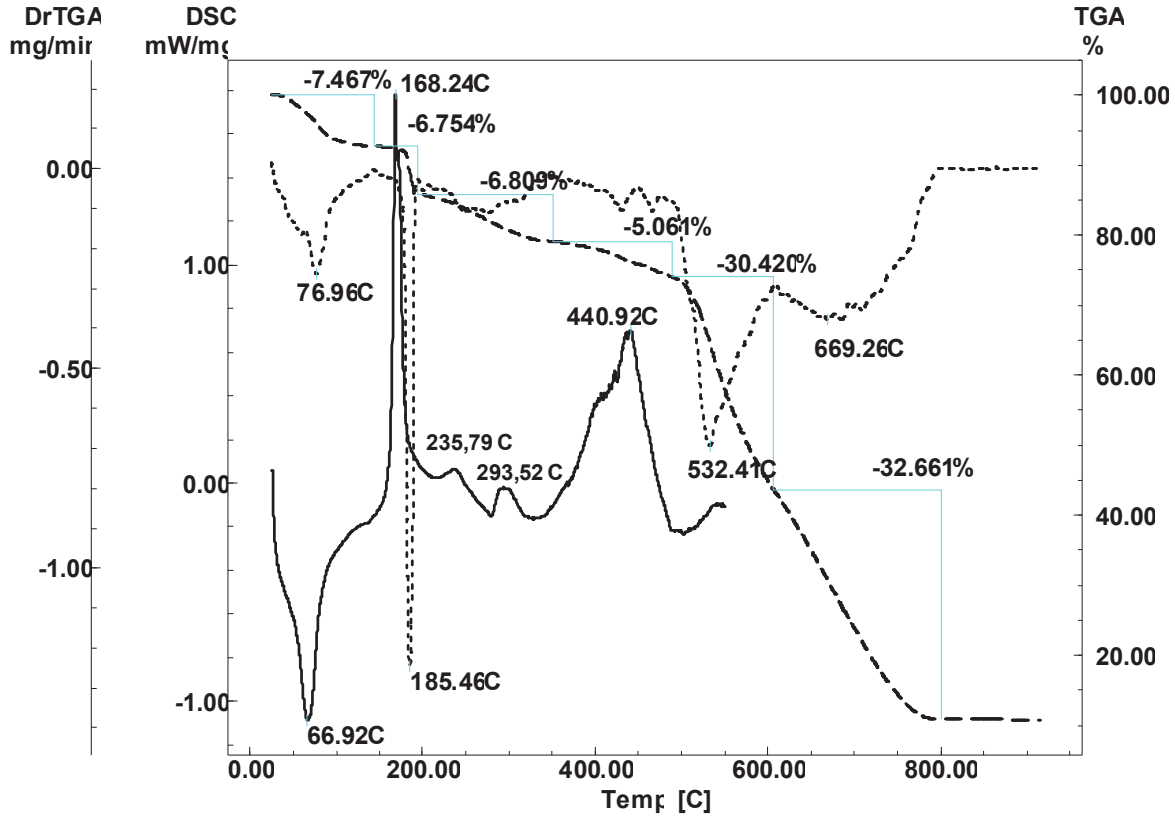


Figura 40 – Curvas de TG (----), DTG (·····) e DSC (—) de uma amostra do conflito de cobre-neocuproína. Análise de TG, em atmosfera de ar sob vazão de 50 cm^3 min^{-1}, sob uma taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}. Análise DSC, em atmosfera de nitrogênio sob vazão de 100 cm^3 min^{-1}) sob uma taxa de aquecimento de 10 ºC min^{-1}. No DSC o pico endotémico é para baixo.

Os dados apresentados na **Figura 40** mostram que ocorrem eventos de perda de massa na curva do ensaio de TG (realizada em um cadinho de platina, sem tampa, contendo 14,6 mg de neocuproína) em temperaturas

correspondentes a um evento endotérmico seguido de outros eventos exotérmicos ocorridos na curva do ensaio de DSC (realizado em panela de alumínio com tampa, contendo 1,81 mg de neocuproína).

O primeiro evento endotérmico, observado na curva de DSC, com temperatura de pico de 66 ºC ocorreu em temperatura muito próxima ao primeiro evento de perda de massa, observado na curva TG. O evento ocorreu em temperatura *onset* de 60 ºC, enquanto a temperatura de pico obtida na curva de DTG foi de 77 ºC.

O evento observado na curva TG em temperatura de 60 ^{0}C, ocorreu com perda de massa de 7,5 %, cuja perda é atribuída à saída de moléculas de água fisiossorvida, contidas no complexo de Cobre-neocuproína.

O segundo evento presente na curva de DSC é exotérmico, ocorrendo em temperatura de 168 ºC. Este evento, diferententemente do observado no primeiro processo, provavelmente, corresponde a um rearranjo da molécula, mudando a estrutura do complexo formado entre Cobre II e 2 moléculas de neocuproína, de quadrado planar para uma estrutura tetraédrica, mais estável e menos energética [123].

Após este rearranjo, há dois novos processos de perda de massa, ambos com valores de 7% observados na curva TG, ocorrendo logo após a temperatura de pico, 168 ºC, da curva DSC, pico exotérmico atribuído ao rearranjo da molécula. Essas duas perdas de massa correspondem a dois eventos exotérmicos de menor intensidade com temperaturas de pico de 236 ºC e 293 ºC, respectivamente, os quais podem estar relacionados à perda

dos dois íons nitratos da molécula. Estes eventos são observados na curva TG pela perda de massa de 6,7% (temperaturas *onset* 176 ºC) e perda de massa com 6,8% (temperaturas *onset* 227,0 ºC), respectivamente. A curva de DTG apresenta o segundo pico com valor de 185,5 ºC.

Levando em consideração a fórmula, **$[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}$ $2(NO_3^-)\cdot 5H_2O$,** proposta para o composto sintetizado nas análises anteriores, os três primeiros processos de perda de massa foram caracterizados segundo o seguinte esquema:

$$[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\ 2(NO_3^-)\cdot 5H_2O \rightarrow [Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\ 2(NO_3^-)\cdot (5\text{-}X)H_2O + XH_2O$$

$$MM([Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\ 2(NO_3^-)\cdot 5H_2O\ ) \rightarrow 100\%$$

$$MM(H_2O) \rightarrow \%(H_2O)$$

$$696{,}16\ g\ mol^{-1} \rightarrow 100\%$$

$$18{,}015\ g\ mol^{-1} \rightarrow X\ \%(H_2O)$$

$$X\ \%(H_2O) = 2{,}59\%$$

Como a percentagem de perda de massa do primeiro processo é de 7,5% e a perda de uma molécula de água representa 2,6%, logo X= 2,9 moléculas

de água, ou seja, no primeiro processo há perda de três moléculas de água. Logo, o segundo processo ocorreu de acordo com o seguinte esquema:

$$[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\ 2(NO_3^-)\cdot 5H_2O \rightarrow [Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\ 2(NO_3^-)\cdot 2H_2O + 3H_2O$$

As perdas de massa descritas no segundo e no terceiro esquemas foram relacionadas à degradação dos íons nitrato das moléculas. Como o composto proposto possui massa de **696,16 g mol^{-1}** e cada íon nitrato possui massa **62,00 g mol^{-1}**, a percentagem em massa de cada íon nitrato é de 8,90% em massa da molécula total. Assim, o segundo e terceiro eventos, com perda de massa, ocorrem seguindo o seguinte esquema:

$$[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}2(NO_3^-)\cdot 2H_2O + O_2 \rightarrow [Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+}\cdot(2)H_2O + 2NO_2 + 2O_2$$

O próximo processo exotérmico observado no DSC com temperatura de pico de 441 ºC é um processo que engloba a decomposição dos íons cobre seguidos da degradação das moléculas de neocuproína. Este único evento exotérmico no DSC engloba mais três processos de perda de massa, observado pela curva de TG/DTG, sendo responsável pela quarta, quinta e sexta perdas de massa. O quarto evento com perda de massa de 5% e temperatura *onset* 389,2 ºC foi atribuído à perda de duas moléculas de água. O quinto evento com perda de massa de 30%, com temperatura *onset* 503,0 ºC

foi atribuído à degradação térmicados anéis de neocuproína. O sexto evento com perda de massa de 33% é devido a eliminação de material carbonáceo. O quarto e quinto eventos aparecem com um único evento na curva TG com Tps = 410 ºC e 430 ºC, o sexto evento com Tp = 532 ºC e o sétimo com TP 670 ºC.

A perda de massa relacionada ao quarto e quinto eventos se deve à saída de moléculas de H_2O de cristalização. A temperatura de saída destas moléculas é tão alta que, provavelmente, estas moléculas estão mais fortemente ligadas ao complexo de Cobre com neocuproína. Assim, como cada molécula de água representa 2,6%, o número de moléculas para uma perda de 5,1% corresponde a duas moléculas de água. Como as moléculas de neocuproína ligadas ao cobre formam um complexo quadrado planar **(2),** as duas moléculas de água poderiam ligar-se ao complexo formando uma estrutura octaédrica. É por isso que, o quarto e o quinto eventos, com perdas de massa, ocorrem como apresentado no seguinte esquema:

$$\mathbf{[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2{\cdot}2H_2O]^{2+} \rightarrow [Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+} + 2\ H_2O}$$

Sendo, portanto, sexto e sétimo processos a representação da etapa final da decomposição térmica das moléculas de neocuproína ligadas ao complexo, gerando produtos voláteis com perda de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente na forma $5CO_2$, $6H_2O$ e $2NO_2$, seguindo os esquemas de degradação já propostos. Assim, as perdas de massa de neocuproína nestas etapas são de 100 g por molécula, representando 14,4% do complexo Cobre-

neocuproína, dividindo por 30,4 % que é a perda de massa dos sexto e sétimo eventos resultando em duas moléculas de neocuproína sendo degradadas. Dessa maneira, pode-se fazer as seguintes relações:

$$[Cu(C_{14}H_{12}N_2)_2]^{2+} + 21\ O_2 \rightarrow CuO + 18\ C + 10\ CO_2 + 4\ NO_2 + 12\ H_2O$$

A perda de massa relacionada ao último evento ocorre com perda de massa de 33%, sendo atribuída à saída dos átomos de carbono restantes. Como a massa de um carbono representa 1,7% da molécula total proposta para o composto sintetizado e a massa perdida no último evento foi de 33%, estando esta relacionada apenas a Carbono, o número de átomos envolvidos no processo é de 19. Comparando com o último esquema apresentado, a quantidade de átomos de Carbono restante seria 18, muito próximo do obtido. Finalmente, o último evento ocorre de acordo com o seguinte esquema:

$$CuO + 18\ C + 9O_2 \rightarrow CuO + 18CO_2$$

Desta forma os átomos de Cobre foram os únicos restantes, somando os eventos com perda de massa, restaram apenas 10,83 %, e levando em consideração que houve incorporação de oxigênio aos átomos de cobre, a percentagem de Cobre é de apenas 8,7%. O valor de Cobre para a massa do composto proposto (MM = 696,16 g/mol) foi de 9,4%, valor muito próximo ao

obtido pela curva TG (8,7%), porém, a percentagem obtida experimentalmente na análise térmica foi idêntica à percentagem de Cobre obtida na absorção atômica.

Assim, provavelmente, o composto sintetizado foi:

Nitrato de diaquabis (neocuproína) Cobre(II) trihidratado, **$[Cu(H_2O)_2(C_{14}H_{12}N_2)_2](NO_3)_2$**.

A **Figura 41** apresenta os espectros de infravermelho para Cloridrato de neocuproína e o composto sintetizado Cobre-neocuproína. Os espectros são bastante parecidos, haja vista que as estruturas das moléculas de partida não sofreram grandes alterações, apenas se encontram complexadas ou não com o Cobre. A análise do espectro obtido será feita com base apenas nas diferenças mais importantes do espectro para o composto sintetizado em relação à neocuproína pura.

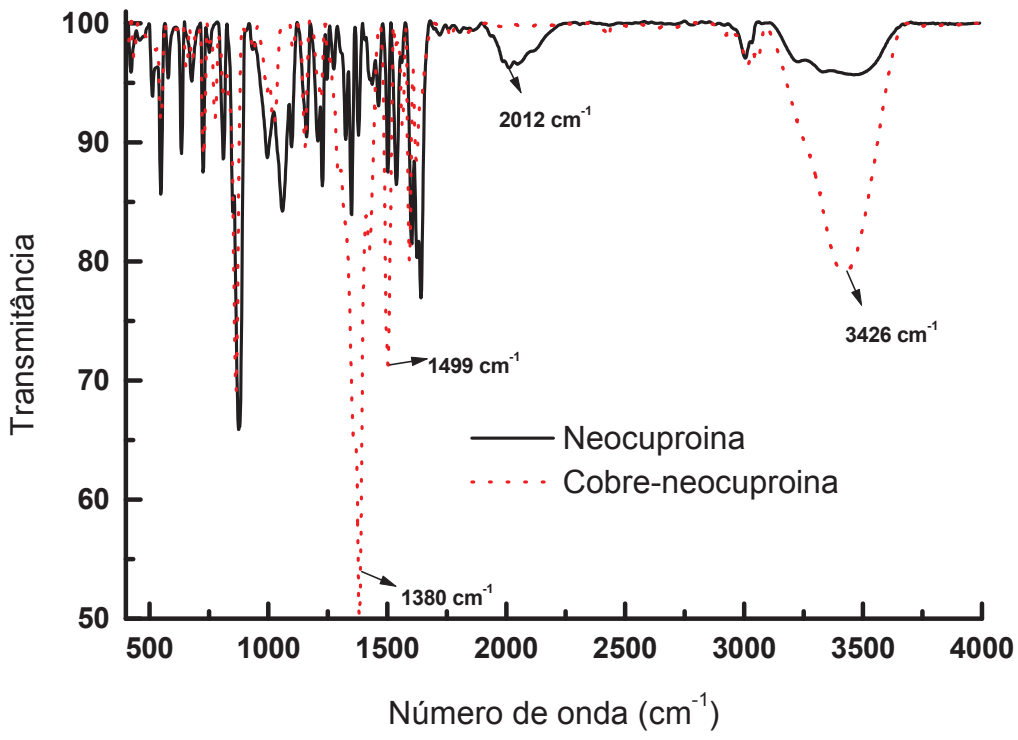


Figura 41 – Espectros de infravermelho para amostras de Cloridrato de Neocuproína (—) e de complexo de Cobre-neocuproína (·····).

Observa-se pela **Figura 41**, que há apenas quatro bandas que são diferentes para as duas amostras, uma 1380, 1499, 2012 e 3426 cm^{-1}. As duas primeiras bandas, de forte intensidade, são características de grupamentos metil ou de íons nitrato. Como não existe a possibilidade de ter havido inserção de grupos metil no composto, as bandas a 1380 e 1499 cm^{-1} devem corresponder a grupos NO_3^-. Esta diferença nos espectros pode ser atribuída aos íons nitrato que fazem parte do composto proposto. Já a terceira banda em 2012 cm^{-1}, presente apenas no Cloridrato de neocuproína, pode ser atribuída ao cloreto ligado ao ligante, pois as bandas do cloro ligadas às moléculas orgânicas ocorrem nesta região, explicando assim o desaparecimento desta

banda no complexo. Por fim, o aumento da última banda, em 3426 cm^{-1} está relacionado a grupos hidroxila, provavelmente devido as moléculas de água coordenadas ao cobre no complexo, para formar uma estrutura octaédrica.

Como perspectivas futuras, pretende-se comparar as propriedades eletroquímicas do material sintetizado com as dos complexos $Cu(NC)_2^{2+}$ e $Cu(NC)_2^{1+}$, bem como a possibilidade de modificação de eletrodos e sua interação com as bases de DNA.

4. CONCLUSÕES

Eletrodos de pasta de carbono (EPC), carbono vítreo (ECV) grafite pirolítico (EGP) e diamante dopado com boro (EDDB) foram modificados com filmes de guanina em condições que garantissem a integridade da base.

Os melhores resultados foram obtidos quando os filmes foram formados em meio ligeiramente ácido, sobre eletrodos de pasta de carbono e grafite pirolítico. Estes eletrodos por apresentarem superfícies mais irregulares, possibilitaram maior aderência do filme à superficíe, não só ao ar como também em solução.

Após obter as melhores condições experimentais para a obtenção da modificação do eletrodo, alterou-se a composição da pasta de carbono, pela introdução do fármaco nitrofural na composição da pasta. Por aplicação de potencial adequado ao eletrodo de trabalho, o nitrofural foi reduzido, eletroquimicamente, ao respectivo nitroânion radical, que ao reagir com a guanina superficialmente imobilizada, originou dímeros de guanina, lesão monitorada na região positiva de potencial utilizando voltametria de pulso diferencial.

Estes resultados foram muito promissores no sentido de se dispor de uma nova metodologia para monitoramento e avaliação do tipo de lesão causada nesta base purínica por diversos tipos de radicais livres, porém a baixa durabilidade do eletrodo modificado tornou a metodologia inviável. Para tentar

resolver este problema outras estratégias de modificação superficial foram estudadas e, para garantir que as mesmas possuíssem condutividade adequada para estudos voltamétricos, pensou-se na utilização de nanotubos de carbono e numa metodologia diferente para modificação para obtenção de suspensões estáveis desse material.

No novo contexto, nanotubos de carbono foram dispersos em solução de lignina e a suspensão resultante utilizada para modificação de eletrodos de carbono vítreo. Com este sensor obteve-se a resposta eletroquímica significativa, na região positiva de potencial, a traços de nitrito. O bom desempenho deste eletrodo se deve, provavelmente, a área maximizada e às propriedades inerentes dos materiais constituintes do compósito formado entre a lignina e os nanotubos de carbono. Nitrito foi determinado, por voltametria de pulso diferencial no intervalo de $4,0 \times 10^{-6}$ – $8,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}, com uma sensibilidade de 0,18 A mol^{-1} L cm^{-2} e limite de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}. O eletrodo modificado mostrou resistência a efeitos de envenenamento e boa sensibilidade e seletividade a nitrito, retendo cerca de 87% de sua atividade após armanezamento em tampão fosfato pH 7,4 a 23 °C por oito dias. É preciso salientar que estes resultados só foram obtidos devido à oxidação, *in situ*, da lignina por ativação eletroquímica.

Outra possibilidade de modificação de ECV com filmes de lignina foi a deposição da lignina sobre o eletrodo a partir de solução contendo tetracloro aurato. O filme formado apresentou resposta catalítica para a redução de H_2O_2. Como várias opções de superfície modificada para a imobilização de guanina ou do próprio DNA já haviam sido obtidas, estudou-se, então, algumas

espécies que poderiam, durante uma etapa de oxidação eletroquímica, produzir radicais livres. Estas espécies foram dopamina e serotonina, como representantes de neurotransmissores, xantina e hipoxantina, como representantes de derivados purínicos e a quercetina, como representante de compostos com atividade antioxidante.

Eletrodos de grafite pirolítico modificados eletroquimicamente em solução de dopamina [59] têm propriedades permeseletivas por exclusão de tamanho e mostraram-se adequados para detecção simultânea de Ácido Úrico (AU), Xantina (XA) e Hipoxantina (HX). Os potenciais de oxidação, obtidos por voltametria cíclica foram: AA = +51 mV, DA = +295 mV, AU = +393 mV, XA = +765 mV e HX = +1083 mV, com limites de detecção, determinados por voltametria de 1,7 x 10^{-7} mol L^{-1} e 2,1 x 10^{-7} mol L^{-1}, para XA e HX, respectivamente. A sensibilidade calculada do eletrodo foi de 3,9 A mol^{-1} L cm^{-2} para uma área geométrica de 0,19 cm^2 sendo que os efeitos de envenenamento superficial não foram observados. Esses valores são da mesma magnitude ou ainda menores do que os encontrados atualmente na literatura [92-94].

Eletrodos de carbono vítreo foram modificados eletroquimicamente em solução de serotonina (5-HT). Estudos voltamétricos demonstraram que esta superfície, após etapa de pré-condicionamento a 1,5 V por 20 s, apresentou atividade catalítica para detecção de neurotransmissores como a serotonina, além de impedir a adsorção dos produtos de oxidação, evitando os efeitos de envenenamento. Esta superfície permitiu a detecção simultânea de 5-HT e dopamina em presença de possíveis interferentes, como ácido ascórbico e

neurotransmissores adrenérgicos encontrados no sistema nervoso central. Houve boa separação dos picos de oxidação com ΔEp mínimo de 130 mV. As correntes de pico obtidas por voltametria de pulso diferencial foram proporcionais a concentração de 5-HT e dopamina (DA) para a faixa de concentração de 0,2-2,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, com limites de detecção de 2,8 x 10^{-8} mol L^{-1} (R^2 0,993) e 1,3 x 10^{-7} mol L^{-1} (R^2 0,973), respectivamente, para 5-HT e DA durante a determinação simultânea dos dois neurotransmissores.

A superfície modificada em solução de 5-HT apresentou melhor adsorção superficial do que aquela obtida em solução de dopamina, já que foi possível modificar a superfície altamente polida do carbono vítreo, o que é impossível usando dopamina como solução modificadora.

Apesar desta diferença, existe uma característica comum ente estes dois filmes: a modificação superficial é permanente e basta a limpeza em eletrólito suporte para que o eletrodo seja continuamente utilizado.

Além dos neurotransmissores, cujo processo de oxidação passa pela formação de radicais livres, os agentes antioxidantes, podem, muitas vezes, dependendo do meio, atuarem como pré-oxidantes. Neste sentido, estudou-se também a quercetina, como representante da classe dos agentes antioxidantes. Neste caso, em particular, não foi possível modificar a superfície dos eletrodos usando a quercetina como agente modificador, porém do ponto de vista analítico, este procedimento nem é necessário, quando se sabe, por medidas experimentais que os produtos de oxidação primária deste composto não envenenam as superfícies do transdutor.

Diferentes superfícies de carbono (eletrodos de carbono vítreo, pasta de carbono, diamante dopado com Boro e grafite pirolítico), foram utilizadas, sem qualquer modificação para determinação analítica deste agente antioxidante usando voltametria de pulso diferencial. Por restrição da janela de potencial de trabalho, evitando dessa forma, a formação dos produtos subsequentes da oxidação primária do analito, responsáveis pela adsorção irreversível nas superfícies de carbono. A quercetina foi, assim, determinada em tampão fosfato pH 7,0, numa faixa de concentração de 2,0 x 10^{-8} - 4,4 x 10^{-7} mol L^{-1}. A variação de potencial de pico, ΔE, foi aleatória, variando ao máximo 10 mV, indicando que não houve envenenamento superficial dos diferentes transdutores utilizados. Os limites de detecção obtidos variaram de 5,1 – 16,2 x 10^{-9} mol L^{-1}, com sensibilidade média de 37,1 A mol^{-1} L cm^{-2} (área geométrica variando entre 0,07 – 0,19 cm^2). Obteve-se boa sensibilidade nas medidas realizadas em pH próximo ao valor fisiológico, o que possibilitaria medidas diretas em matrizes biológicas. Estas características são promissoras para o desenvolvimento de métodos automatizados e miniaturizados para determinação de quercetina em diversas matrizes.

Sistemas químicos capazes de produzir radicais livres $OH^{\bullet}$ e $O_2^{\bullet-}$, responsáveis por danos no DNA, foram estudados em diversos tipos de eletrodos de carbono previamente modificados. O complexo formado entre neocuproína e Cu (I), um composto em potencial para provocar danos no DNA foi sintetizado e caracterizado.

Ao estudar o comportamento eletroquímico das substâncias que poderiam gerar radicais livres durante a etapa eletroquímica de oxidação, eletrodos

modificados e/ou métodos analíticos de quantificação foram desenvolvidos mas não houve tempo hábil para utilizá-los para os propósitos iniciais desta tese. Deste modo, esta etapa pode nortear trabalhos futuros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICASS BIBLIOGRÁFICAS

[1] PAUL, A.; BHATTACHARIA, S. **"Chemistry and biology of DNA-binding small molecules."** *Cur. Sci.,* 102: 212-231, 2012.

[2] ZAMBLE, D. B.; LIPPARD, S. J. **"Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy."** *Biochem. Sci.,* 20: 435- 439, 1995.

[3] DI PASQUA, A. J.; GOODISMAN, J., DABROWIAK, J. C. **"Understanding how the anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell".** *Inorg. Chim. Acta,* 389: 29-35, 2012.

[4] YANG, Z-S.; WANG, Y-L.; ZHAO, G-C. **"The Interaction of Copper-Bipyridyl Complex with DNA and Clevage to DNA."** *Anal. Sci.,* 20: 1127-1130, 2004

[5] VOET, D.; VOET, J.G. **"Biochemistry"**. 2nd ed. New York: *Wiley*, 1995.

[6] LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R. **"Eletrodos Modificados com DNA: Uma Nova Alternativa em Eletroanálise."** *Quim. Nova,* 22: 417-424, 1999.

[7] GOYAL, R. N.; BRAJTER-TOTH, A.; DRYHURST, G.; NGUYEN, N. T. **"A Comparison on the Peroxidase-Catalysed and Eletrochemical Oxidation of Uric Acid".** *Bioelectrochem. Bioenerg.;* 9: 39–60, 1982.

[8] SOUZA, D.; MELO, L. C.; CORREIA, A. N.; LIMA-NETO, P.; FATIBELLO-FILHO, O.; MASCARO, L. H. **"Utilização de Eletrodos Sólidos de Amálgama para a Determinação Analítica de Compostos Orgânicos e Inorgânicos".** *Quim. Nova,* 34: 487-496, 2011.

[9] WONG, E.L.; GOODING, J. J. **"The Electrochemical Monitoring of the Perturbation of Charge Transfer through DNA by Cisplatin."** *J. Am. Chem. Soc.,* 129: 8950-8951, 2007.

[10] SIONTOROU, C. G.; NIKOLELIS, D. P., ULRICH J. KRULL, U. J. **"Flow Injection Monitoring and Analysis of Mixtures of Hydrazine Compounds Using Filter-Supported Bilayer Lipid Membranes with Incorporated DNA"** *Anal. Chem.*, 72: 180-186, 2000.

[11] STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. **"Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold."** *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677. 1998.

[12] BRETT A. M. O.; DICULESCU, V. C. **"Electrochemical Study of Quercetin–DNA Interactions: Part I. Analysis in incubated solutions."** *Bioelectrochemistry.* 64: 133-141, 2004.

[13] BRETT A. M. O.; DICULESCU, V. C. **"Electrochemical Study of Quercetin–DNA Interactions: Part II. In Situ Sensing with DNA Biosensors."** *Bioelectrochemistry.* 64: 143-150, 2004.

[14] FOJTA, M. **"Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage."** *Electroanalysis,* 14: 1449-1463, 2002.

[15] BRETT A. M. O.; VIVAN M.; FERNANDES I. R.; PIEDADE, J. A. P. **"Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA."** *Talanta,* 56: 959-970, 2002.

[16] MELLO, L. M.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M.; KUBOTA, L. T. **"Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor."** *Biosen. Bioelectr.,* 21: 1374-1382, 2006.

[17] KORBUT, O.; BUČKOVÁ, M.; LABUDA, J.; GRÜNDLER, P. **"Voltammetric Detection of Antioxidative Properties of Flavonoids Using Electrically Heated DNA Modified Carbon Paste Electrode."** *Sensors*, 3: 1-10, 2003.

[18] WISEMAN, H.; HALLIWELL, B.; **"Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer."** *Biochem. J., 313:* 17-29, 1996.

[19] BRETT A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA M. A. **"Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode"**. *Bioelectrochem. Bioenerg.,* 42:175-178, 1997.

[20] BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; MACEDO, T. A.; RAIMUNDO, D.; MARQUES, M. H.; LA-SCALEA, M. A. **"Electrochemical determination of carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode."** *Electroanalysis,* 8: 992-995, 1996.

[21] JIANG, X.; LIN, X. **"Overoxidized polypyrrole film directed DNA immobilization for construction of electrochemical micro-biosensors and simultaneous determination of serotonin and dopamine."** *Anal. Chim. Acta.,* 537: 145-151, 2005.

[22] WANG, S.; LU, L.; LIN, X. **"A Selective Voltammetric Method for Uric Acid Detection at a Glassy Carbon Electrode Modified with Electrodeposited Film Containing DNA and Pt-Fe(III) Nanocomposites."**. *Electroanalysis,* 16: 1734-1738, 2004.

[23] PALEČEK, E.; BARTOŠÍK, M.; **"Electrochemistry of nucleic acids"**, *Chem. Rev*., 112: 3427-3481, 2012.

[24] BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F.-M.; **"Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode"** *J. Electroanal. Chem.,* 429: 95-99, 1997.

[25] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. **"On the Adsorption and Electrochemical Oxidation of DNA at a Glassy Carbon Electrode."** *J. Electroanal. Chem.,* 366: 225-231, 1994.

[26] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. **"An EIS study of DNA-modified electrodes."** *Electrochim. Acta*, 44: 4233 – 4239, 1999.

[27] BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA M. A.; CRUZ, M. L. **"Voltammetric Behavior of Nitroimidazoles at a DNA-Biosensor."** *Electroanalysis,* 9: 1132-1137, 1997.

[28] LA-SCALEA, M.A. **"Mecanismo de Ação Biológica de Nitroimidazóis e Seu Comportamento Voltamétrico".** *Rev. Farm. Univ. São Paulo,* 34: 59-75, 1998.

[29] LA-SCALEA M. A.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, E.I.; BRETT, A. M. O. **"Voltammetric Behaviour of Benznidazole at DNA-electrochemical Biosensor."** *J. Pharmac. Biom. Analysis*, 29: 561 –568, 2002.

[30] SERRANO, S. H. P. **"Contribuição ao Desenvolvimento de Eletrodos Modificados com DNA e Biossensores de DNA."** *Tese de livre docência*, IQ-USP, São Paulo, 1999.

[31] PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B. "**Buffers for pH and Metal Ion Control."** New York: *Chapman and Hall*, 1983.

[32] LURIE, J. **"Handbook of Analytical Chemistry."** Moscow: *Mir Publishers*, 1975.

[33] MILCZAREK, G., **"Kraft lignin as dispersing agent for carbon nanotubes."** *J. Electroanal. Chem.,* 638:178-181, 2010.

[34] BUORO, R. M. ; DA SILVA, R. P. ; BACIL, R. P. ; LIMA, A. W. O. ; RABOCZKAY, T.; CIDES DA SILVA, L. C.; SERRANO, S. H. P. **"Electrochemical Characterization and Evaluation of the Analytical Potentialities of Glassy Carbon Electrodes Modified with Extracted Lignin from Black (Kraft) Liquor."** *ECS Transactions*, 43, 119-126, 2012.

[35] SILVA, R. P.; SERRANO, S. H. P. **"Electrochemical oxidation of biological molecules at carbon paste electrodes pre-treated in guanine solutions."** *J. Pharm. Biom. Anal.,* 33: 735–744, 2003.

[36] DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J. MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. **"Electrocatalytic activity of oxidation products of guanine and 5-GMP towards the oxidation of NADH."** *Electrochimica Acta,* 53: 829–836, 2007.

[37] DOCAMPO, R., MORENO, S. J. **"Free-radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic-agents and phagocytic-cells on Trypanosoma-Cruzi".** *Rev. Infect. Dis.,* 6: 233-238, 1984.

[38] DOCAMPO, **“Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs”.** *Chem. Biol. Interact.,* 73: 1-27, 1990.

[39] GRINGAUZ, A. **“Introduction to Medicinal Chemistry – How Drugs Act and Why.”** New York: *Wiley - VCH*, 1997.

[40] SQUELLA, J.A, NUÑEZ-VERGARA, L.J.,CAMPERO, A.; MARAVER, J.; JARA-ULLOA, P.;CARBAJO, J**. "Electrochemical reduction of 2-nitroimidazole in aqueous mixed medium”**, *J. Electrochem. Soc.,* 154: 77-81, 2007.

[41] CADENAS, E. **“Biochemistry of oxygen toxicity”**. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 79-110, 1989.

[42] JULIÃO, M. S. S.; ALMEIDA, E. C., LA-SCALEA, M. A.; FERREIRA, N. G.; COMPTON, R. G.; SERRANO, S. H. P. S. **“Voltammetric Behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode”**. *Electroanal*., 17: 269 – 274, 2005.

[43] JULIÃO, M. S. S.; FERREIRA, E. I.; FERREIRA, N. G; SERRANO, S. H. P. **“Voltammetric detection of the interactions between RNO2 circle- and electron acceptors in aqueous medium at highly boron doped diamond electrode (HBDDE)”**. *Eletrochim Acta*, 51: 5080 – 5086, 2006.

[44] COSTENTIN, C.; HAJJ, V.; ROBERT, M.; SAVÉANT, J-M.; TARD, C. **“Effect of Base Pairing on the Electrochemical Oxidation of Guanine.”** *J. Am. Chem. Soc.,* 132: 10142–10147, 2010.

[45] SUBRAMANIAN, P.; DRYHURST, G. **“Electrochemical oxidation of guanosine formation of some novel guanine oligonucleosides”.** *J. Electroanal. Chem.;* 224: 137-162, 1987.

[46] BRETT A. M. O.; DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A. P. **“Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode”.** *Bioelectrochemistry*, 55: 61-62, 2002.

[47] BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA M. A. **“Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor”.** *Electroanalysis.* 9: 1132-1137, 1997.

[48] LA-SCALEA M. A.; CHIN, C. M.; CRUZ, M.L.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, E.I. **"Dissociation and electrooxidation of primaquine diphosphate as an approach to the study of anti-chagas prodrugs mechanism of action".** *Bioelectrochemistry*, 53: 55 – 59, 2001.

[49] LA SCALEA, M. A; SERRANO, S. H. P; GUTZ, I. G. R; "**DNA-modified electrodes: A new alternative for electroanalysis".** *Quimica Nova*, 22: 417 – 424, 1999.

[50] Santiago-Rodríguez, L.; Sánchez-Pomales, G.; Cabrera, C. R.; **"Electrochemical DNA Sensing at Single-walled Carbon Nanotubes Chemically Assembled on Gold Surfaces".** *Electroanalysis,* 22: 2817-2824, 2010.

[51] MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A. E MELO, D. C. **"Análise da madeira do Pinus oocarpa. Parte II - Caracterização estrutural da lignina de madeira moída"**. Revista Árvore, *R. Árvore*, 29: 471 – 478, 2005.

[52] PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E. A., MORAIS, S. A. L. **"Isolamento e Analise Estrutural de Ligninas".** *Quim. Nova,* 16: 435 – 448, 1993.

[53] IBARRA, D., DEL-RIO, J. C., GUTIÉRREZ, A., RODRÍGUEZ, I. M., ROMERO, J., MARTÍNEZ, M. J., MARTÍNEZ, A. T., "**Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps"**. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 74: 116 -122, 2005.

[54] ZHUANG, J. M., WALSH, T., LAM, T. **"Application of ferric sludge to immobilize leachable mercury in soils and concrete"***, Environmental Technology*, 24: 897 – 902, 2003.

[55] WILSON, S. A., HUTH, T. C., SKOGERBOE, R.K., **"Voltammetric methods for determination of metal-binding by fulvic-acid".** *Anal. Chem*., 52: 1515 – 1518, 1980.

[56] J.R. TUSCHALL, P.L. BREZONIK, **"Evaluation of the copper anodic stripping voltammetry complexometric titration for complexing capacities and conditional stability constants"** *Anal. Chem*. 53: 1986-1989, 1981.

[57] ZAWADZKI, M., RUNGE, T.M., RAGAUSKAS, A.J., **"Facile detection of *ortho*- and *para*-quinone structures in residual kraft lignin by NMR spectroscopy"**, *J. Pulp Paper Sci.,* 26:102-105, 2000.

[58] GIERER, J., **"Chemistry of delignification"**, *Wood Sci. Technol.,* 19: 289-312, 1985.

[59] SILVA, R. P., LIMA, A.W.O. SERRANO, S. H. P., **"Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution"**. *Anal. Chim. Acta,* 612:89-98, 2008.

[60] YOUNG, T. E.; BABBIT, B. W. **"Electrochemical study of the oxidation of alpha-methyldopamine, alpha-methylnoradrenaline, and dopamine".** *J. Org. Chem.* 48: 562-566, 1983.

[61] ZHANG, F.; DRYHURST G. **"Oxidation chemistry of dopamine: possible insights into the age-dependent loss of dopaminergic nigrostriatal neurons".** *Bioorg. Chem.,* 21: 392-410, 1993.

[62] HAWLEY M. D.; TATAWAWADI S. V.; PIEKARSKI, ADAMS R. N. **"Electrochemical Studies of the Oxidation Pathways of Catecholamines."** *J. Am. Chem. Soc.* 89: 447–450, 1967.

[63] STREIN, T. G.; EWING A. G. **"Laser Activation of Microdisk Electrodes Examined by Fast-Scan Rate Voltammetry and Digital Simulation."** *Anal. Chem*., 66: 3864-3872, 1994.

[64] DUPONT, L., GUILLON, E., **"Removal of hexavalent chromium with a lignocellulosic substrate extracted from wheat bran."** *Environ. Sci. Technol.* 37: 4235 -4241, 2003.

[65] CAI, C.; CHEN, J. **"Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes."** *Anal. Biochem.,* 332: 75-83, 2004.

[66] WANG, J. **"Nanomaterial-based electrochemical biosensors."** *Analyst.,* 130: 421-426, 2005.

[67] KATZ, E.; WILLNER, I.; WANG, J. **"Electroanalytical and bioelectroanalytical system based on metal and semiconductor nanoparticles".** *Electroanalysis,* 16: 19-44, 2004.

[68] IIJIMA, S. **"Helical microtubules of graphitic carbon."** *Nature.* 354:56-58, 1991.

[69] WONG, E. W.; SHEEHAN, P. E.; LIEBER, C. M. **"Nanobeam mechanics: Elasticity, Strength, and toughness of nanorods and nanotubes".** *Science,* 277: 1971-1975, 1997.

[70] NARDELLI, M. B.; FATTEBERT, J.-L.; ORLIKOWSKI, D.; ROLAND, C.; ZHAO, Q.; BERNHOLC, J. **"Mechanical properties, defects and electronic behavior of carbon nanotubes"** *Carbon,* 38: 1703-1711, 2000.

[71] BANKS, C. E.; DAVIES, T. J.; WILDGOOSEE, G.; COMPTON, R. G. **"Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites."** *Chem. Commun.,* 7: 829-841, 2005.

[72] MOORE, R. R.; BANKS, C. E.; COMPTON, R. C. **"Electrocatalytic detection of thiols using an edge plane pyrolytic graphite electrode."** *Analyst*., 129: 755-758, 2004.

[73] WANG, J.; LI, M.; SHI, Z.; LI, N.; GU, Z. **"Electrochemistry of DNA at single-wall carbon nanotubes."** *Electroanalilys,* 16: 140-144, 2004.

[74] GUISEPPI-ELIE, A.; LEI, C.; BAUGHMAN, R. H., **"Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase on Carbon Nanotubes."** *Nanotechnology,* 13: 559-564, 2002.

[75] LIU, Y.; LIU, L.; DONG, S. **"Electrochemical characteristics of glucose oxidase adsorbed at carbon nanotubes modified electrode with ionic liquid as binder."** *Electroanalysis* 19: 55-59, 2007.

[76] SALIMI, A.; MIRANZEDEH, L.; HALLAJ, R.; MAMKHEZRJ, H. **"Picomolar Detection of Hydrogen Peroxide at Glassy Carbon Electrode Modified with NAD^+ and Single Walled Carbon Nanotubes".** *Electroanalysis*, 20: 1760-1768, 2008.

[77] MANISANKAR, P.; ABIRAMA SUNDARI, P. L.; SASIKUMAR, R.; PALANIAPPAN, S. P. **"Electroanalysis of some common pesticides using conducting polymer/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode."** *Talanta*, 76: 1022-1028, 2008.

[78] YAO, X.; WANG, Y.; WEN, L. **"Sensitive Detection of NADH by Ferrocenylalkanethiol founctionalized Multiwall Carbon Nanotubes electrodes."** *Anal. Lett*., 41: 1236-1247, 2008.

[79] LIJINSKI, W., EPSTEIN, S.S. **"Nitrosamines as Environmental Carcinogens."** *Nature,* 225: 21-23, 1970.

[80] MOORCROFT, M.J., DAVIS, J., COMPTON, R.G., **"Detection and determination of nitrate and nitrite: a review."** *Talanta,* 54: 785-803, 2001.

[81] MILCZAREK, G., **"Lignosulfonate-Modified Electrode for Electrocatalytic Reductionof Acidic Nitrite."** *Electroanalysis,* 20: 211 – 214, 2008.

[82] PAIXÃO, T.R. L.C., ROCHA, J.A.R., KOSMINSKY, L., BERTOTTI, M., **"Anodic oxidation of nitrite at a molybdenum oxide layer".** *Electroanalysis* 13:155-160, 2001.

[83] NUGENT, J.M., SANTHANAM, K.S.V., RUBIO, A., AJAYAN, P.M. **"Fast Electron Transfer Kinetics on Multiwalled Carbon Nanotube Microbundle Electrodes."** *Nano* Lett., 1: 87-91, 2001.

[84] LEWIS, N.G., **"A 20th century roller coaster ride: a short account of lignifications".** *Curr. Opin. Plant Biol.,* 2 :153-162, 1999.

[85] YANG, H.-H., MCCREERY, R.L.**, "Effects of surface monolayers on the electron-transfer kinetics and adsorption of methyl viologen and phenothiazine derivatives on glassy carbon electrodes."** *Anal. Chem*., 71: 4081-4087, 1999.

[86] KATHIWALA M., AFFUM A. O., PERRY, J., BRAJTER-TOTH, A. **"Direct measurements of xanthine in 2000-fold diluted xanthinuric urine with a nanoporous carbon fiber sensor."** *Analyst*, 133: 810-816, 2008.

[87] FORD, E.S.; LI, C.; COOK, S.; CHOI, H.K. **"Serum Concentrations of Uric Acid and the Metabolic Syndrome Among US Children and Adolescents."** *Circulation*, 115: 2526-2532, 2007.

[88] BEN-ZVI, I.; GREEN, Y.; NAKHOUL, F.; KANTER, Y.; NAGLER, R.M. **"Effects of diabetes mellitus, chronic renal failure and hemodialysis on serum and salivary antioxidant status."** *Nephron. Clin. Pract.*, 105: 114-120, 2007.

[89] TAWA, R.; KITO, M.; HIROSE, S. *Chem. Lett.*, 10: 745-748, 1981.

[90] ANDRIOLO, A., ONO, I. E, SILVA-FILHO, A. P., AJZEN H. **"Xantinúria, nefrolitíase e insuficiência renal, relato de um caso."** *J. Bras. Nefrol.* 18: 268-272, 1996.

[91] VILLALONGA, R.; MATOS, M.; Cao, R. **"Construction of an amperometric biosensor for xanthine via supramolecular associations."** *Electrochem. Commun.,* 9: 454-458, 2007.

[92] WANG, Z.; DONG, X; LI, J. **"An inlaying ultra-thin carbon paste electrode modified with functional single-wall carbon nanotubes for simultaneous determination of three purine derivatives."** *Sensors and Actuators B.* 131: 411-416, 2008.

[93] XIAO, F.; RUAN, C.; LI, J.; LIU, L.; ZHAO, F.; ZENG, B. **"Voltammetric Determination of Xanthine with a Single-Walled Carbon Nanotube-Ionic Liquid Paste Modified Glassy Carbon Electrode".** *Electroanalysis,* 20: 361 – 366, 2008.

[94] SUN, Y.; FEI, J.; WU, K.; HU, S. **"Simultaneous electrochemical determination of xanthine and uric acid at a nanoparticle film electrode".** *Anal Bioanal Chem.,* 375: 544 – 549, 2003.

[95] ZEN, J.-M.; LAI, Y.-Y.; YANG, H.-H.; KUMAR, A. S. **“ Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode”.** *Sensors and Actuators B.* 84: 237-244, 2002.

[96] ROBINSON, G. M.; IWUOHA, E. I.; SMYTH, M. R. **“Characterisation of electrosynthetic L-dopa-melanin films by electrochemical and spectroelectrochemical techniques.”** *Anal. Chim. Acta,* 43: 3489-3496, 1998.

[97] RUBIANES M. D.; RIVAS, G. A. **“Highly selective dopamine quantification using a glassy carbon electrode modified with a melanin-type polymer”.** *Anal. Chim. Acta,* 440: 99-108, 2001.

[98] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **“Statistics for analytical chemistry.”** 2nd *ed. Chichester: Ellis H. Halsted Press Limited*,. p. 115. 1988.

[99] O’DONNELL, M. J.; TANG, K.; KOSTER, H.; SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. **“High density, covalent attachment of DNA to silicon wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry.”** *Anal. Chem.*, 69: 2438-2443, 1997.

[100] ROBINSON H. R., HOOD, S. D. M.J., BELL, C. J., NUTT, D. N., **“Dopamine and social anxiety disorder.”** *Rev. Bras. Psiquiatr.* 28: 263-264, 2006.

[101] WEI, J., HE, J-B, CAO, S-Q, ZHUA, Y-W, WANGA, Y. HANGA, G-P., **“Enhanced sensing of ascorbic acid, dopamine and serotonin at solid carbon paste electrode with a nonionic polymer film.”** Talanta, 83: 190-196, 2010.

[102] SARADA, B. V., RAO, T. N. TRYK, D. A., FUJISHIMA, A., **“Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron doped diamond electrodes.”** *Anal. Chem.,* 72 :1632-1638, 2000.

[103] ZHANG, W.; XIE, Y.; GU, J.; AI, S.; WANG, J.; YAMAMOTO, J.; JIN, L. **"Liquid chromatography with amperometric detection at a nano crystalline Ce-doped lead dioxide film modified electrode for determination of (*R*)-Salsolinol, (*R*)-*N*-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters in Parkinsonian patients cerebrospinal fluid."** *Analyst,* 129: 229-234, 2004.

[104] CLAUDE, B.; NEHMÉ, R.; MORIN, P. **"Analysis of urinary neurotransmitters by capillary electrophoresis: Sensitivity enhancement using field-amplified sample injection and molecular imprinted polymer solid phase extraction."** *Anal. Chim. Acta,* 699: 242-248, 2001.

[105] SWAMY, B. E. K.; VENTON, B. J. **"Carbon nanotube-modified microelectrodes for simultaneous detection of dopamine and serotonin in vivo."** *Analyst,* 132: 876-884, 2007.

[106] WU, K.; FEI, J.; HU, S. **"Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes."** *Anal Biochem.,* 318: 100 – 106, 2003.

[107] LU, L.; WANG, S.; LIN,X. **"Attachement of DNA to the Carbon Fiber Microelectrode via Gold Nanoparticles for Simultaneous Determination of Dopamine and Serotonin."** *Anal. Chem.,* 20: 1131-1135, 2004.

[108] LI, Y. HUANG, X. CHEN, Y., WANG, L., LIN, X. **"Simultaneous determination of dopamine and serotonin by use of covalent modification of 5-hydroxytryptophan on glassy carbon electrode"**. *Microchim. Acta* 164:107-112, 2009.

[109] ABBASPOUR, A,; NOORI, A. **"A cyclodextrin host–guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine."** *Biosens. Bioelectron.,* 26: 4674-4680, 2011.

[110] SELVARAJU, T.; RAMARAJ, R. **"Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and serotonin at poly(phenosafranine) modified electrode".** *Electrochem. Comm.;* 5: 667-672, 2003.

[111] VOLIKAKIS, G. J.; EFSTATHIOU, C. E. **"Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry".** *Anal. Chim. Acta,* 551: 124-131, 2005.

[112] MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **"Conteúdo de Miricetina, Quercetina e Kaempferol em chás cormercializados no Brasil"**, *Cienc. Tecnol. Aliment.,* 26: 380-385, 2006.

[113] LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. **"Previous Note: Total Phenolic Content in Brazilian Teas."** *Braz. J. Food Technol.,* 7: 187 –190, 2004.

[114] BOOTS, A.W., HAENEN, G.R.M.M, BAST A. **"Review: Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical."**, *Eur. J . Pharmacol.* 585: 325-337, 2008.

[115] DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. **"Flavonóides:potencial terapêutico no estresse oxidativo."** *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.,* 28: 241-249, 2007.

[116] BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; ANTUNES, L. M. G. A.; BIANCHI, M. L. P. **"Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais e Ações Biológicas."** *Alim. Nutr.,* 15: 285-292, 2004.

[117] TIMBOLA A.K., SOUZA, C.D., GIACOMELLI C. SPINELLI A. **"Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution."** *J. Braz. Chem. Soc.,* 17: 139-148, 2006.

[118] BRETT A.M.O., GHICA M.-E. **"Electrochemical Oxidation of Quercetin."** *Electroanalysis,* 15: 1745-1750, 2003.

[119] ZARE, H. R.; NAMAZIAN, M.; NASIRIZADEH, N. **"Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies."** *J. Electroanal. Chem.;* 584: 77–83, 2005.

[120] WANG, J.; ZHOU, N.; ZHU, Z.; HUANG, J.; LI, G. **"Detection of flavonoids and assay for their antioxidant activity based on enlargement of gold nanoparticles."** *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 1199–1205, 2007.

[121] FARGHALY, O. A. **"Voltammetric Determination of Quercetin in Urine at Carbon Paste Electrode."** *Anal. Let.,* 38: 2247–2258, 2005

[122] JIN G.-P, HE J.-B., RUI Z.-B., MENG F.-S. **"Electrochemical behavior and adsorptive stripping voltammetric determination of quercetin at multi-wall carbon nanotubes-modified paraffin-impregnated graphite disk electrodeholic."** *Electrochim. Acta,* 57: 4341-4346, 2006.

[123] SMITH, R. M., MARTELL, A. E. ***"Critical Stability Constants",*** *Plenum Press,* New York, 1975.

[124] Y. YAMINI, A. TOMADDON, **"Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of copper in water samples."** *Talanta,* 49: 119-124, 1999.

[125] T. SHTOYKO, J. N. RICHARDSON, C. J. SELISKARA, W. R. HEINEMAN, W. R. **"Spectroelectrochernical sensing based on multimode selectivity simultaneously achievable in a single device 14. Enhancing sensitivity of a metal complex ion by ligand exchange."** *Electrochim. Acta,* 50: 3191–3199, 2005.

[126] MAZZANTI, M. **"Ion permeability of the nuclear envelope."**, *News Physiol. Sci*. 13: 44–50. 1998.

[127] HUBER, P. W. **Weght-Loss in Patients with Hematological Neoplasias is as Associated with Stimulated Immunity** *FASEB J.*, 7: 1367-1375, 1994.

[128] PRATVIEL, G.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. **Carbon-Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs** *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, *34:* 746-769, 1995.

[129] BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. **"Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission."** *Chem. Rev.*, *98*: 1109-1151, 1998.

[130] ROUTIER, S.; BERNIER, J. L.; WARING, M. J.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; BAILLY, C. **"Synthesis of a functionalized salen copper complex and its interaction with DNA."** *J. Org. Chem.,* 61: 2326-2331, 1996.

[131] ALIPÁZAGA, M. V., CERCHIARO, G., MOYA, H., COICHEV, N. **"Oxidative DNA Damage Induced by S(IV) in the Presence of Cu(II) and Cu(I) Complexes."** *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 1302-1312, 2009.

[132] LAMUR, E., ROUTIER, S., BERNIER, J-L. CATTEAU, P-C. **"Oxidation of Cu-II to Cu-III, free radical production, and DNA cleavage by hydroxy-salen-copper complexes. Isomeric effects studied by ESR and electrochemistry."**. *J. Am. Chem. Soc.,* 121: 1862-1869, 1999.

[133] NEBESAR, B. **"Spectrophotetric Determination of Copper in Tellurium + Related Thermoeletric Compounds of Bismuth Telluride Type with 2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthroline."** *Anal. Chem.,* 36: 1961–1965, 1964.

[134] LEE, G.; ROSSI, M. V.; COICHEV, N.; MOYA, H. D., **"The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples."** *Food Chem.*,126: 679-686 2011.

[135] JIMENEZ, P., ROUX, M. V., DAVALOS, J. Z., TEMPRADO, M. **"Heat capacities and enthalpies of transitions of three nitrobenzonitriles**." *Thermochim. Acta,* 394: 25–29 2002.

[136] AHRENS, M., MAIER, J. **"Thermodynamic properties of $BaCeO_3$ and $BaZrO_3$ at low temperatures."** *Thermochim. Acta,* 443: 189–196, 2006.

[137] ABATE, L., PALECZ, B., GIANCOLA, C., DELLA GATTA, G., "**Heat capacities, and enthalpies and entropies of fusion of some uncharged small peptides (N-acetylamino acid amides and 2,5-diketopiperazines)."** *J. Chem. Thermodyn.* 29: 359–368, 1997.

[138] PAK, J., PYDA, Q.M., NOWAK-PYDA, E., WUNDERLICH, B. **"Can one measure precise heat capacities with DSC or TMDSC? A study of the baseline and heat-flow rate correction**," *J. Therm. Anal. Cal*., 82: 565–574, 2005