



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ**

**INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS CARBOXÍLICOS E
ÍONS METÁLICOS NA DEGRADAÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES**

TESE DE DOUTORADO

Eduardo Winter

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder

Campinas

2007

“A oportunidade nunca chega para aquele que espera,
senão para aquele que vai a sua procura”

Paul J. Meyer

Dedico este trabalho à pessoa mais importante de minha vida, que mesmo longe geograficamente, sempre esteve ao meu lado, com todo amor e carinho, Maria Olímpia, minha mãe!!!

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora e amiga Susanne Rath, onde por meio de sua orientação, conselhos, incentivo e amizade fez com que este trabalho fosse possível e ao prof. Jarbas R. Rohwedder, que foi mais que um co-orientador, foi um bom amigo que ajudou no desenvolvimento e no suporte desta tese.

A amiga Lucia Codognoto, que com seu grande conhecimento e paciência pode contribuir, não só com o crescimento deste trabalho, mas com o meu aprimoramento como pesquisador.

Aos meus grandes amigos, Thiago, Héber, Mercival, André, Edgard, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando de uma forma ou de outra.

Aos meus sempre amigos de laboratório, que vão além do laboratório, Maria do Socorro, Paula, Gabriela, Larissa e Jonas, que sempre prontos, me ajudaram a cumprir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, Mônica, Regiane G., Regiane F., Raquel, Keity, Leandro, Mathias, Fran, Flávia, Marcela, Monica, Gustavo, Patrícia, Camila, Marcelo, José Luiz, Juliana e Gabriel, pelo bom convívio e ajudas nesses meses e anos que passamos juntos.

Aos funcionários do Instituto de Química por sempre estarem prontos a ajudar nos momentos que precisei.

Agradeço a FAPESP pelo auxílio pesquisa, ao CNPq pela bolsa de doutorado PGI ofertada e ao Instituto de Química – UNICAMP pela oportunidade de tornar possível a realização deste trabalho.

Agradeço, acima de tudo, à minha família, meus pais Maria Olímpia e Wilson, meu irmão, Wilson Jr, e a todos os familiares que me ajudaram por mais esta etapa de minha vida, onde superamos dificuldades, distância e imensas saudades.

Por último, mas não menos importante, não poderia deixar de agradecer a Deus, que me deu lucidez para conseguir ultrapassar todos os imensos obstáculos para a realização deste doutorado, me dando forças para prosseguir e não desanimar e a certeza de que esta é mais uma etapa vencida de muitos que ainda estão por vir.

Curriculum Vitae - Eduardo Winter

Dados Pessoais

Nome Eduardo Winter
Nascimento 23/11/1979 – Curitiba - PR - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2003 – 2007 Doutorado em Ciências – área: Química Analítica.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
2002 - 2003 Mestrado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
1998 - 2001 Graduação em Química Industrial.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil
1994 - 1997 Ensino Profissional de nível técnico em Técnico Em Química.
Instituto Politécnico do Paraná, IPE, Brasil

Formação complementar

1999 Curso de curta duração em Análise Microbiológica de Águas.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil
2000 Extensão universitária em Química Aplicada a Criminalística.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil
2000 Extensão universitária em Cromatografia Líquida.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil
2000 Extensão universitária em Técnicas de Liderança.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil
2001 Extensão universitária em Controle de Qualidade Em Laboratório Analítico.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brasil

Atuação Profissional

1 Instituto Nacional de Propriedade Industrial
08/2006 - atualmente **Pesquisador – Servidor Público**
1. Exame de pedidos de patentes de invenção e modelos de utilidade.

2 Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Auxiliar didático - Graduação
2/2003 - 7/2005
1. Química orgânica I
2. Química analítica instrumental I
3. Química analítica quantitativa
4. Química analítica qualitativa

3 Fundação da Universidade Federal do Paraná Centro de Pesquisa e Processamento - FUNPAR-CEPPA
3/2001 -12/2001 **Estágio**, Laboratório Físico Química e Instrumental de Alimentos
1. Análises instrumentais e físico-químicas em alimentos em geral

4 Matizcollor Industria e Com de Tintas - MATIZCOLLOR
1/2001 - 2/2001 **Estágio**, Controle de Qualidade, Controle de Qualidade e Desenvolvimento
1. Desenvolvimento e controle de qualidade de revestimentos moveleiros em geral

5 Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR
3/2000 -12/2000 **Monitoria - Graduação**
1. Química Geral III / IV

6 Todeschini Ind e Com de Produtos Alimentícios - TODESCHINI
4/1998 - 6/2000 **Serviço Técnico Especializado**, Laboratório, Controle de Qualidade físico-químico e microbiológico e Desenvolvimento de Novos Produtos e Matérias Primas
Especificação
1. Atendimento ao cliente e controle de qualidade
Treinamento, Laboratório, Controle de Qualidade e Desenvolvimento de Novos Produtos e Matérias Primas
1. Curso de Higiene Industrial
Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório, Controle de Qualidade e Desenvolvimento de Novos Produtos e Matérias Primas

Linhas de Pesquisa

1. Alimentícia

7 Fundação da Universidade Federal do Paraná Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas - FUNPAR-LPH

7/1997 - 3/1998 **Estágio**, Laboratório, Análise Físico-Química Instrumental e Microbiológica
1. Análises de águas subterrâneas

8 Phytoderm Botica de Produtos Magistrais Ltda - PHYTODERM

Pesquisa e Desenvolvimento

Linhas de Pesquisa

1. Cosméticos em geral

9 Instituto Ambiental do Paraná - IAP

3/1996 - 4/1997 **Estágio**, Laboratório, Laboratório de Análises Físico Química
1. Análises de águas e efluentes industriais em geral

Produção científica

Artigos completos publicados em periódicos

- 1 CODOGNOTO, L.; WINTER, E.; REYS, F. G. R.; RATH, S.; Comportamento eletroquímico da N-nitrosotiazolidina ácido caboxílico sobre eletrodos de ouro e mercúrio, Química Nova, **no prelo**.
- 2 PEREIRA, M.S.S.; WINTER, E.; GUIMARÃES, J.R.; RATH, S.; FOSTIER, A.H.; “A simple voltammetric procedure for arsenic speciation and removal monitoring in fresh water” Environ. Chem. Letter, v. 5, 137-141, 2007.
- 3 WINTER, E., CODOGNOTO, L., RATH, S.
Electrochemical behavior of dopamine at a mercury electrode in the presence of citrate: analytical applications. Analytical Letters: v. 40, p. 1197 – 1208, 2007.
- 4 LUCIA CODOGNOTO, EDUARDO WINTER, JONAS A. R. PASCHOAL, HUGO B. SUFFREDINI, MURILO F. CABRAL, SERGIO A. S. MACHADO, SUSANNE RATH.
Electrochemical Studies of Interaction of 3,3'-Dithiodipropionic Acid Self-Assembled Monolayer on Gold Electrodes with Dopamine, Talanta, v. 72, p. 427-433, 2007.
- 5 WINTER, E., CODOGNOTO, L., RATH, S.
Electrochemical behavior of dopamine in the presence of citrate: reaction mechanism. Electrochimica Acta. Itália: v. 51, p.1282-1288, 2006.
- 6 WINTER, E., CARVALHO, R. M., KUBOTA, L. T., RATH, S.
Effect of carboxylate compounds on the electrochemical behavior of dopamine at a electrode mercury. Journal of Brazilian Chemical Society. Brasil: , v.14, p.564 - 569, 2003.

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

- 1 WINTER, E., CODOGNOTO, L., VARGAS, M. C. M., GOMES, P. C. F. L., VIEIRA, F. P., MONTEIRO, G. B., RATH, S.
Aplicação de celda eletroquímica em fluxo como detector amperométrico na determinação de cloranfenicol In: 28 Reunião anula da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
- 2 WINTER, E., SPIANDORIN, C. G., PASCHOAL, J. A. R., RATH, S.
Determinação de dopamina em fármacos por FIA com detecção espectrofotométrica In: 13o Encontro Nacional de Química Analítica \ 1o Congresso Ibero-americano de Química Analítica, 2005, Niterói, RJ.
- 3 WINTER, E., GARCIA, A. L. L., CORREIA, C. R. D., RATH, S.
Determinação de pKa de compostos N-Benzoil-O-Alquil-Tiocarbamatos por espectrofotometria In: 13o Encontro Nacional de Química Analítica \ 1o Congresso Ibero-americano de Química Analítica, 2005, Niteroi - RJ.
- 4 CODOGNOTO, L., WINTER, E., REYS, F. G. R., MACHADO, S. A. S., RATH, S.
Determinação eletroanalítica de N-nitrosaminas sobre eletrodos de ouro utilizando voltametria de onda quadrada de redissolução In: 28 Reunião anula da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
- 5 CODOGNOTO, L., WINTER, E., PASCHOAL, J. A. R., RATH, S.
Eletrodos de ouro modificados por SAM aplicados na determinação de dopamina em medicamentos In: 13o Encontro Nacional de Química Analítica \ 1o Congresso Ibero-americano de Química Analítica, 2005, Niteroi - RJ.
- 6 WINTER, E., CODOGNOTO, L., RATH, S.
Influência do citrato na oxidação eletroquímica de neurotransmissores In: 28 Reunião anula da

- Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
- 7 CODOGNOTO, L., WINTER, E., GOMES, P. C. F. L., VIEIRA, F. P., SIMOES, T. A., RATH, S.
Potencialidade eletroanalítica de eletrodos de ouro modificados por SAM na análise de fármacos por FIA In: 28 Reunião anula da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
 - 8 LIBERO, M. M., WINTER, E., RATH, S., SILVA, J. A. F.
Separation and Determination of Nitrate and Nitrite in dairy products by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection In: 11o Simposio Latinoamericano LACE 2005, 2005, Guarujá - SP.
 - 9 SILVA, M. F. A., WINTER, E., RATH, S.
Análise dos produtos de oxidação da dopamina na presença de mercúrio por cromatografia líquida de alta eficiência In: XXVI Congresso Latino-americano de Química / 27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
 - 10 WINTER, E., SILVA, M. F. A., RATH, S.
Determinação de dopamina em medicamentos por voltametria cíclica utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio In: XXVI Congresso Latino-americano de Química / 27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
 - 11 SILVA, M. F. A., WINTER, E., RATH, S.
Doenças neurodegenerativas: caracterização e determinação de produto de oxidação da dopamina In: XII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas.
 - 12 WINTER, E., RATH, S.
Avaliação da influência de metais de transição na oxidação da dopamina In: Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luis.
 - 13 WINTER, E., CARVALHO, R. M., KUBOTA, L. T., RATH, S.
Comparação do comportamento eletroquímico da dopamina, L-dopa e serotonina na presença de citrato por voltametria cíclica In: Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luis.

Trabalhos resumidos expandidos publicados em anais de evento

- 1 WINTER, E., CODOGNOTO, L., PIRES, L. F., TAVARES, M., CAETANO, J., RATH, S.
Determinação eletroanalítica de fenitrothion em tomate utilizando a voltametria de onda quadrada In: XV Simpósio brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina - PR.
- 2 CODOGNOTO, L., WINTER, E., PASCHOAL, J. A. R., MACHADO, S. A. S., RATH, S.
Eletrodos de ouro modificados por SAM aplicados a determinação de cloranfenicol por FIA In: XV Simpósio brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina - PR.
- 3 CODOGNOTO, L., WINTER, E., REYS, F. G. R., RATH, S.
Estudo comparativo do comportamento eletroquímico de nitrosaminas sobre eletrodos de ouro e HMDE In: XV Simpósio brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina - PR.
- 4 WINTER, E., CODOGNOTO, L., RATH, S.
Influência de compostos carboxílicos quelantes no comportamento eletroquímico da dopamina In: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina - PR.
- 5 PEREIRA, M. S. S., WINTER, E., RATH, S., FOSTIER, A. H.
Reações eletroquímicas envolvidas na determinação de As(III) na presença de Cu(II) por voltametria de redissolução In: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina.
- 6 WINTER, E., CARVALHO, R. M., KUBOTA, L. T., RATH, S.
Estudo eletroquímico da interação dopamina-citrato. Proposta de mecanismo de reação In: XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis.
- 7 WINTER, E., CARVALHO, R. M., KUBOTA, L. T., RATH, S.
Estudo do comportamento eletroquímico da dopamina em eletrodo de mercúrio na presença de ácidos carboxílicos In: XIII SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara.

Orientações

1. **José Luis Neto M. Menendez**, “Avaliação do comportamento espectroeletroquímico da carbidopa na presença e ausência de carboxilatos”. Estágio dirigido de QG-860 Projeto de Pesquisa Química, primeiro semestre de 2006, DQA, IQ, UNICAMP (co-supervisão).
2. **Camila G. Spiandorin**, “Determinação de dopamina em fármacos por FIA”. Estágio dirigido de QG-860 Projeto de Pesquisa Química, segundo semestre de 2005, DQA, IQ, UNICAMP (co-supervisão).

INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS CARBOXÍLICOS E ÍONS METÁLICOS NA DEGRADAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

RESUMO

Muitas doenças neurodegenerativas são associadas com disfunções de neurotransmissores, em particular catecolaminas, no cérebro. Numerosas pesquisas têm indicado que íons metálicos podem induzir estresse oxidativo - dependente da neurodegeneração de dopamina e são responsáveis pelo aparecimento de doenças neurodegenerativas. Em estudos prévios foi verificado que alguns carboxilatos diminuem a velocidade de oxidação de catecolaminas e inibem a passivação de eletrodos sólidos durante a análise voltamétrica destes compostos fenólicos. Este trabalho teve por objetivo estudar a influência de carboxilatos (EDTA, NTA, EGTA, DTPA, acetato, citrato e oxalato) e íons metálicos (Ce(IV), Fe(III) e Hg(II)) durante a oxidação de neurotransmissores (dopamina, serotonina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa) no intuito de estabelecer mecanismos de reações que possam contribuir no esclarecimento do papel destes compostos no processo de degeneração dos neurotransmissores, assim como compreender como os carboxilatos inibem o envenenamento do eletrodo durante a varredura de potencial. Para estes propósitos foram empregadas as técnicas de espectrofotometria, voltametria e espectroeletroquímica. A cela espectroeletroquímica de camada delgada desenvolvida incorporou um sistema de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho uma minigrade de Pt. O sistema foi caracterizado usando *o*-tolidina e $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ e permitiu o monitoramento das reações *in situ*. Os resultados obtidos mostraram que os carboxilatos desprotonados interagem com os produtos intermediários formados durante a oxidação das catecolaminas por meio de ligações de hidrogênio, sendo estas interações dependentes do pH do meio, estruturas do carboxilato e do próprio neurotransmissor. Foi proposto um mecanismo eletroquímico para a oxidação de aminas biogênicas na presença de carboxilatos no eletrodo de platina. A estabilização dos produtos intermediários formados inibe a formação de compostos poliméricos que são responsáveis pelo envenenamento do eletrodo. Do mesmo modo, os carboxilatos retardam ou inibem a oxidação química de algumas aminas biogênicas por íons metálicos.

INFLUENCE OF CARBOXYLATE AND METAL IONS ON THE DEGRADATION OF NEUROTRANSMITTERS

ABSTRACT

Several neurological disorders are associated with improper catechoamine regulation in the brain. Numerous researches have indicated that metallic ions can induce oxidative stress-dependent neurodegeneration of dopamine, and are responsible for the induction of neurodegenerative diseases. In previous work was verified that some carboxylates diminishes the oxidation rate of catecholamines and inhibit the well known solid state electrode passivation during voltammetric analysis of these phenolic compounds. The aim of this work was to study the influence of carboxylates (EDTA, NTA, EGTA, DTPA, acetate, oxalate and citrate) and metallic ions (Ce(IV), Fe(III) and Hg(II)) during the oxidation of neurotransmitters (dopamine, serotonin, epinephrine, norepinephrine and L-dopa) in order to establish putative reaction mechanism which could contribute to understand the role of these compounds in neurodegenerative processes, as well as comprehend how the carboxylates inhibit the electrode fouling during potential scan. For these purposes, the studies were carried out using spectrophotometric, voltammetric and spectroelectrochemical techniques. The spectroelectrochemical thin layer cell developed incorporated a three electrode system, using a Pt-minigrade as working electrode. The system was characterized employing α -tolidine and $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ and allowed monitoring the electrode reactions *in situ*. The results obtained showed that the deprotonated carboxylates interacts with the intermediates formed at the electrochemical oxidation of catecholamines by hydrogen bonds. These interactions are dependent on the pH of the medium, as well as on the chemical structures of the carboxylates and neurotransmitters itself. An electrochemical mechanism for the oxidation of biogenic amines in the presence of carboxylates at the platinum electrode is proposed. The stabilization of the intermediates formed inhibits the formation of polymeric compounds that are responsible for the electrode fouling. In the same manner, the carboxylates retards or inhibit the chemical oxidation of some biogenic amines by metallic ions by the same reaction pathway.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxvii
Lista de Abreviaturas	xxix
Prefácio	01
I. Introdução	03
1. Neurotransmissores.....	05
2. Influência de íons metálicos no comportamento de neurotransmissores.....	09
3. Interação entre carboxilatos de neurotransmissores.....	13
4. Espectroeletroquímica.....	17
4.1. Eletrodos opticamente transparentes.....	19
4.2. Celas espectroeletroquímicas.....	20
4.3. Espectroeletroquímica no estudo de neurotransmissores.....	23
II. Objetivos	25
III. Experimental	29
1. Reagentes e soluções.....	31
1.1. Aminas biogênicas.....	31
1.2. Compostos carboxílicos.....	32
1.3. Íons metálicos.....	32
1.4. Eletrólitos suporte.....	33
1.5. Solução de o-tolidina para caracterização do sistema espectroeletroquímico.....	33
1.6. Solução de caracterização do sistema eletroquímico.....	33
1.7. Solução para limpeza do eletrodo de platina.....	34
2. Instrumentação.....	34
3. Procedimentos.....	37
3.1. Medidas eletroquímicas.....	37
3.2. Estudo cinético da interação da dopamina na presença de carboxilatos e íons metálicos.....	38
3.3. Estudos espectroeletroquímicos.....	38
IV. Resultados e discussão	41
1. Construção e caracterização do sistema espectroeletroquímico.....	42

1.1. Caracterização eletroquímica da SEC.....	42
1.2. Caracterização espectroeletroquímica da SEC.....	44
2. Interação de neurotransmissores com compostos carboxílicos.....	48
2.1. Comportamento eletroquímico de aminas biogênicas na ausência e presença de carboxilatos utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio.....	49
2.1.1. Norepinefrina na presença e ausência de citrato.....	49
2.1.2. Epinefrina na presença e ausência de citrato.....	50
2.2. Avaliação dos carboxilatos no processo de oxidação da dopamina empregando eletrodo de platina.....	53
2.2.1. Influência de compostos carboxílicos na degradação da dopamina.....	54
2.2.2. Estudo comparativo entre os carboxilatos avaliados...	56
2.2.3. Estudo da interação do EDTA com outras aminas biogênicas.....	62
2.3. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na presença de carboxilatos.....	64
2.3.1. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na ausência de carboxilatos.....	64
2.3.2. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na presença de carboxilatos.....	73
2.3.3. Estudo comparativo entre o espectro eletrônico teórico com os resultados experimentais na avaliação da interação entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação da DA.....	82
2.3.4. Avaliação estereoquímica da interação entre os compostos carboxílicos e o leucodopaminocromo.....	88
2.4. Estudo espectroeletroquímico das demais aminas biogênicas na presença de compostos carboxílicos.....	91
2.4.1. L-dopa na presença e ausência de EDTA e citrato.....	91
2.4.2. Norepinefrina na presença e ausência de EDTA e citrato.....	95
2.4.3. Epinefrina na presença e ausência de EDTA e citrato.....	99
2.4.4. Serotonina na presença e ausência de EDTA e citrato.....	101
2.4.5. Estudo comparativo do comportamento espectroeletroquímico de diferentes aminas	

biogênicas.....	106
3. Influência de metais de transição no comportamento redox de neurotransmissores na ausência e presença de carboxilatos.....	107
3.1. <i>Comportamento eletroquímico da dopamina em meio de citrato na ausência e presença de íons metálicos, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio.....</i>	107
3.1.1. Avaliação da influência do íon Ce(IV) no comportamento eletroquímico da dopamina.....	108
3.1.2. Avaliação da influência pH na interação entre dopamina e citrato na presença de Ce(IV).....	111
3.2. <i>Estudo cinético da oxidação química da dopamina no meio de citrato ou EDTA na presença de íons metálicos por espectrofotometria.....</i>	112
3.2.1. Estabilidade da dopamina na presença de EDTA ou citrato e influência de íons metálicos.....	113
3.3. <i>Avaliação do comportamento espectroeletroquímico da DA na presença de metais de transição.....</i>	117
4. Propostas de mecanismos da influência de compostos carboxílicos no comportamento redox de diferentes aminas biogênicas.....	119
4.1. <i>Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para dopamina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa na ausência de compostos carboxílicos.....</i>	121
4.2. <i>Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para dopamina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa na presença de compostos carboxílicos.....</i>	124
4.3. <i>Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para serotonina na presença e ausência de carboxilatos.....</i>	128
4.4. <i>Oxidação química de aminas biogênicas por metais de transição na presença de citrato ou EDTA.....</i>	131
V. Conclusões.....	137
VI. Perspectivas futuras.....	141
VI. Referências.....	145

INDICE DE FIGURAS

I Introdução

Figura 1.1 - Classificação de alguns neurotransmissores com respeito sua função química.....	06
Figura 1.2 – Diagrama dos caminhos de reações pela qual grupos catecolatos e hidroximatos podem interagir com ferro.....	12
Figura 1.3 – Voltamograma cíclico obtido para dopamina.....	15
Figura 1.4 - Mecanismo proposto o comportamento eletroquímico da dopamina na presença e ausência de citrato no eletrodo de mercúrio.....	16
Figura 1.5 - Vista frontal e lateral de uma cela espectroeletroquímica em camada delgada que utiliza um eletrodo de minigrade metálico.....	21

III Experimental

Figura 3.1 – Aminas biogênicas avaliadas.....	31
Figura 3.2 – Estruturas dos ácidos carboxílicos.....	32
Figura 3.3 – Diagrama esquemático do sistema espectroeletroquímico.....	35
Figura 3.4 - Sistema empregado para obtenção dos dados espectroeletroquímicos, destacando a célula eletroquímica e os eletrodos, o reservatório para remoção de oxigênio e a bomba peristáltica para introdução e remoção da solução em estudo e lavagem da célula de medida.....	36

IV Resultados e discussão

Figura 4.1 - Voltamogramas cíclicos para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de diferentes concentrações de eletrólito suporte.....	43
Figura 4.2 - Estudo espectroeletroquímico da <i>o</i> -tolidina no sistema SEC desenvolvido.....	44
Figura 4.3 - Avaliação da influência da velocidade de varredura sobre o comportamento SEC da <i>o</i> -tolidina durante uma varredura realizada por voltametria cíclica.....	45
Figura 4.4 - Esquema do caminho óptico na cela.....	47

SEC.....	
Figura 4.5 – Voltamograma cíclico para a norepinefrina em eletrodo de gota pendente de mercúrio na ausência e presença de citrato.....	50
Figura 4.6 – Comportamento da epinefrina com adição de citrato ao meio.....	51
Figura 4.7 – Neurotransmissores avaliados e seus prováveis produtos de oxidação.....	52
Figura 4.8 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o citrato.....	53
Figura 4.9 - Voltamograma cíclico da DA na ausência e presença de diferentes carboxilatos.....	54
Figura 4.10 - Variação da I_{pa} na ausência e presença de diferentes compostos carboxílicos.....	55
Figura 4.11 – Distribuição de cargas baseado nos valores das constantes de dissociação (pK_a).....	58
Figura 4.12 - Superfície de resposta: E^0 do segundo par redox da DA na presença de diferentes carboxilatos, correlacionando o número de carboxilas presente em cada composto carboxílico com o número de carboxilas desprotonadas de cada composto.....	59
Figura 4.13 - Variação do potencial do E_{pc} da DA na ausência e presença de carboxilato em função do carboxilato avaliado e o número de carboxilas desprotonadas.....	60
Figura 4.14 - Variação do E_{pc} em função do número de carboxilas desprotonadas.....	61
Figura 4.15 - Resposta relativa da corrente anódica entre varreduras cíclicas sucessivas, usando o eletrodo de platina para diferentes aminas biogênicas na presença e ausência de EDTA.....	63
Figura 4.16 - Espectros da DA durante a varredura de potencial.....	64
Figura 4.17 – (A) Espectros da DA durante a varredura de potencial. (B) Espectros da DA em função do potencial aplicado.....	65
Figura 4.18 – Variação dos valores de absorbância das bandas durante o processo redox da DA livre com potencial fixo em função do tempo. E: 0,20 V.....	66
Figura 4.19 - Variação dos valores de absorbância das bandas durante o processo redox da DA livre com potencial fixo em função do tempo. E: 0,70	67

V.....	
Figura 4.20 - Mecanismo de oxidação da DA.....	68
Figura 4.21 - Espectros da DA durante a varredura de potencial.....	69
Figura 4.22 – Espectros da DA em função do tempo e a potencial constante de 0,20 V.....	72
Figura 4.23 - Espectros do EDTA em KNO_3 0,10 mol L^{-1} , pH: 7,5, durante a varredura de potencial.....	73
Figura 4.24 - Espectros da DA na presença de a) citrato e b) EDTA.....	75
Figura 4.25 - Variação da absorbância em função do tempo para o processo redox da DA na presença de citrato (pH 5,0).....	76
Figura 4.26 - Comportamento eletroquímicos da DA na presença de citrato ou EDTA em pH 7,0.....	78
Figura 4.27 - Espectros da DA na ausência e presença de EGTA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V.....	80
Figura 4.28 - Espectros da DA na ausência e presença de NTA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V.....	80
Figura 4.29 - Espectros da DA na ausência e presença de DTPA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V.....	81
Figura 4.30 - Espectros da DA na ausência e presença de acetato em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V.....	81
Figura 4.31 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o acetato.....	84
Figura 4.32 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o EDTA por meio de ligações de hidrogênio realizadas somente por meio das carboxilas.....	87
Figura 4.33 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o EDTA por meio de ligações de hidrogênio realizadas pelos nitrogênios e carboxila...	87
Figura 4.34 - Espectros da L-dopa em função do potencial aplicado.....	92
Figura 4.35 – Espectros da L-dopa na presença de carboxilatos em três diferentes potenciais.....	93
Figura 4.36 - Espectros da L-dopa, L-dopa + citrato e L-dopa + EDTA aplicando um potencial de 0,80 V.....	94

aplicando um potencial de 0,80 V.....	95
Figura 4.37 – Espectros da norepinefrina em função do potencial aplicado.....	95
Figura 4.38 - Variação da absorbância em 405 e 485 nm e da corrente para o processo redox da norepinefrina durante a varredura de potencial.....	96
Figura 4.39 - Comportamento espectroeletroquímico da norepinefrina na presença de: a) Citrato; b) EDTA.....	97
Figura 4.40 - Voltamogramas da norepinefrina na presença e ausência de citrato ou EDTA.....	97
Figura 4.41 - Comportamento espectroeletroquímico da norepinefrina na presença de citrato ou EDTA.....	98
Figura 4.42 - Espectros da epinefrina em função do potencial aplicado.....	99
Figura 4.43 - Comportamento espectroeletroquímico da EP na presença de: a) Citrato; b) EDTA.....	100
Figura 4.44 - Comportamento espectroeletroquímico da epinefrina na presença de citrato e EDTA.....	100
Figura 4.45 - Voltamogramas da epinefrina na presença e ausência de citrato ou EDTA.....	101
Figura 4.46 - Espectros da serotonina em função do potencial aplicado.....	102
Figura 4.47 - Comportamento espectroeletroquímico da serotonina na presença de: a) Citrato; b) EDTA.....	103
Figura 4.48 - Comportamento espectroeletroquímico da epinefrina na ausência na presença de citrato e EDTA.....	104
Figura 4.49 - Voltamogramas da serotonina na presença e ausência de citrato e EDTA.....	105
Figura 4.50 – Voltamogramas cíclicos para a dopamina na presença de citrato e Ce(IV).....	109
Figura 4.51 – Voltamogramas cíclicos. Avaliação do comportamento eletroquímico da dopamina com a adição de Ce(IV).....	110
Figura 4.52 – Variação do E_{pc} e da I_{pc} do pico em função do pH.....	111
Figura 4.53 – Formação de dopaminocromo no processo de oxidação da dopamina por Ce(IV) em meio tampão citrato, pH 7,5.....	113
Figura 4.54 – Formação de dopaminocromo (480 nm) através da oxidação de dopamina por Fe(III), Ce(IV) e Hg(II) na presença de EDTA.....	114
Figura 4.55 – Formação do dopaminocromo pela oxidação de dopamina por Ce(IV) na presença de citrato e EDTA.....	115
Figura 4.56 – Formação do dopaminocromo pela oxidação de dopamina por	

Hg(II) na presença de citrato e EDTA. Dopamina.....	116
Figura 4.57 – Formação do dopaminocromo pela oxidação da dopamina por Fe(III) na presença de citrato e EDTA.....	117
Figura 4.58 – Espectros do Ce(IV) na presença de EDTA durante a varredura de potencial.....	118
Figura 4.59 - Espectros UV/VIS realizados durante a aplicação do E_{inv} para a DA na presença de: Citrato; EDTA; Ce(IV) + EDTA; Ce(IV) + Citrato.....	119
Figura 4.60 - Voltamograma cíclico da dopamina na ausência e presença de EDTA.....	120
Figura 4.61 - Estrutura geral para as aminas biogênicas: DA, epinefrina, NEP e L-dopa.....	121
Figura 4.62 - Mecanismo geral para a oxidação de diferentes aminas biogênicas (DA, EP, NEP e L-dopa).....	123
Figura 4.63 - Equilíbrio ácido-base para o ácido cítrico e EDTA.....	124
Figura 4.64 - Proposta de interação entre o produto de oxidação da DA (R1:H, R2: H e R3:H), NEP (R1:H, R2: OH e R3:H) e L-dopa (R1:H, R2: H e R3:COOH) com citrato e EDTA.....	126
Figura 4.65 - Mecanismo de oxidação modelo para DA, norepinefrina e L-dopa na presença de citrato ou EDTA.....	127
Figura 4.66 - Mecanismo de oxidação da serotonina.....	129
Figura 4.67 - Mecanismo de oxidação da ST na presença de EDTA.....	130
Figura 4.68 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Fe(III) e ausência de carboxilatos.....	132
Figura 4.69 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Hg(II) na presença de citrato ou EDTA.....	134
Figura 4.70 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Ce(IV) na presença de citrato e EDTA.....	135

INDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Comparação do ΔE_p de um sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ para uma cela convencional e a cela espectroeletroquímica.....	42
Tabela 4.2. Parâmetros obtidos no processo eletroquímico da DA na presença de diferentes carboxilatos no eletrodo de platina.....	57
Tabela 4.3. Comprimentos de onda de máxima absorbância dos espectros eletrônicos teóricos para os produtos intermediários da reação de oxidação da DA.....	70
Tabela 4.4. Comparação entre os comprimentos de onda de máximo de absorção encontrados por meio do uso da espectroeletroquímica com valores calculados teoricamente para a DA e seus compostos intermediários originados no processo de oxidação eletroquímica.....	71
Tabela 4.5. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletroquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre citrato e LDC.....	84

Tabela 4.6. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletróquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre acetato e LDC.....	85
---	----

Tabela 4.7. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletróquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre EDTA e LDC.....	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – aminocromo
AQ – aminoquinona
Cit – citrato
DA – dopamina
DC – dopaminocromo
DQ – *o*-dopaminoquinona
DTPA – ácido dietilenotriamina pentacético
E – potencial
 $E^{0'}$ - potencial formal
ECE – reação eletroquímica – química – eletroquímica
EDTA – ácido etileno diamino tetraacético
EE – reação eletroquímica – eletroquímica
 E_f – potencial final
EGTA – ácido etilenobis(oxietilenonitrilo) tetraacético
 E_i – potencial inicial
 E_{inv} – potencial de inversão
EP – epinefrina
 E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico
FIA – análise por injeção em fluxo
FO – fibra ótica
HMDE – eletrodo de gota pendente de mercúrio
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IR – infravermelho
LAC – leucoaminocromo
LDC – leucodopaminocromo
NEP – norepinefrina
NIR – infravermelho próximo
NTA – ácido nitrilotriacético
OTE – eletrodos opticamente transparentes
SAQ \cdot – semiaminoquinona radical
SEC – espectroeletroquímica
SNC – sistema nervoso central
ST – serotonina
UV – ultravioleta
Vis – visível
 ΔE_p – diferença de potencial
 ΔE_{pa} – diferença de potencial entre picos anódicos
 ΔE_{pc} – diferença de potencial entre picos catódicos

A

tese versa sobre a influência de compostos carboxílicos no processo de degradação de aminas biogênicas, na presença e ausência de íons metálicos, fazendo uso da espectroeletroquímica como principal ferramenta.

O que motivou o desenvolvimento deste trabalho de tese foram os resultados obtidos na dissertação de mestrado, intitulado *“Estudo do comportamento eletroquímico de aminas biogênicas na presença de carboxilatos utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio”*. Neste trabalho foi verificado que compostos carboxílicos, em particular citrato e EDTA, em determinadas condições, alteram o comportamento eletroquímico da dopamina. Enquanto os metais de transição catalisam a oxidação da dopamina, determinados carboxilatos tendem a inibir ou retardar o processo de oxidação/degradação da dopamina. Ainda, foi verificado que o carboxilato tende a inibir a passivação de eletrodos sólidos durante o processo de oxidação da dopamina. Esses resultados são importantes do ponto de vista biológico e químico uma vez que podem auxiliar na compreensão do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas que são atribuídas ao estresse oxidativo, bem como permitem delinear métodos eletroanalíticos para a determinação de neurotransmissores e outros compostos fenólicos, sem o problema do envenenamento da superfície eletródica.

Embora tenha sido possível propor um mecanismo que explicasse o comportamento eletroquímico da dopamina na presença de citrato no eletrodo de mercúrio, seriam necessários muitos estudos adicionais, visando comprovar o mecanismo proposto, assim como avaliar se esses fenômenos também ocorrem com outros neurotransmissores e outros carboxilatos. Uma vez que os produtos intermediários são instáveis, seria necessário o emprego de técnicas que permitem monitorar o processo *in situ*, o que justifica o uso da espectroeletroquímica, principal objeto desta tese.

Para facilitar a compreensão dos resultados e discussões desta tese, apresentamos no capítulo de introdução alguns resultados importantes obtidos na dissertação de mestrado, inclusive o mecanismo eletroquímico proposto da

interação de citrato e dopamina. Outras informações podem ser encontradas no seguintes artigos:

- Eduardo Winter, Lúcia Codognoto, Susanne Rath. **Electrochemical behavior of dopamine in the presence of citrate: reaction mechanism.** *Eletrochimica Acta*, v. 51, p.1282-1288, 2006.
- Eduardo Winter, Rosangela M. de Carvalho, Lauro T. Kubota; Susanne Rath. **”Effect of carboxylate compounds on the electrochemical behavior of dopamine at a mercury electrode”.** *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.14, n.4, p.564-569, 2003.
- Eduardo Winter, Lúcia Codognoto, Susanne Rath. **“Electrochemical Behavior of Dopamine at mercury electrode in the presence of citrate: Analytical Applications”.** *Analytical Letters*. v. 40, p. 1197 – 1208, 2007.

A tese está apresentada em sete capítulos. No primeiro, Capítulo I - Introdução, se apresenta uma revisão do estado da arte sobre doenças neurodegenerativas e neurotransmissores, uma breve descrição da principal técnica aplicada, espectroeletroquímica, e sua aplicação nos estudos de neurotransmissores; o Capítulo II apresenta os objetivos da tese e o Capítulo III enfoca a parte experimental. No capítulo seguinte, Capítulo IV, são apresentados os resultados e discussões desta tese e, para finalizar, os Capítulos V, VI e VII tratam das conclusões, perspectivas futuras e referências bibliográficas, respectivamente.

I. Introdução

1. Neurotransmissores

Nos últimos 50 anos diversos trabalhos científicos sobre o comportamento de catecolaminas e outras aminas biogênicas foram apresentados na literatura [Dryhurst, *et al.*, 1982; Hawley, *et al.*, 1967; Sulzer & Pothos, 2000, Winter, *et al.*, 2003, Strausak, *et al.*, 2001; Giganian & Farmer, 2002, Winter, *et al.*, 2006].

O interesse na química das catecolaminas, em particular a dopamina (DA), deve-se ao fato de muitos desses compostos estarem envolvidos diretamente em processos de neurotransmissão e, conseqüentemente, relacionados com doenças neurodegenerativas, entre essas o Mal de Parkinson e Alzheimer [GROSSMAN, *et al.*, 2001].

Diversas áreas como, por exemplo, áreas médica e farmacêutica, possuem grande interesse no desenvolvimento de pesquisas que envolvem neurotransmissores, uma vez que estas substâncias são importantes para o sistema nervoso central (SNC), assim como também para o sistema periférico.

A partir da década de 90 houve uma mudança radical no modo de pensar sobre a atuação dos neurotransmissores no SNC. Primeiramente, é preciso considerar que nesta época o número de transmissores conhecidos saltou de aproximadamente dez, considerados “clássicos” (principalmente aminas e aminoácidos), para mais de quarenta devido a descoberta de uma grande quantidade de neuropeptídeos.

Outro ponto que deve ser considerado é o fato de que, originalmente, um composto para ser considerado um neurotransmissor devia ser encontrado no espaço sináptico, região microscópica entre o terminal de um neurônio e a superfície receptora de outro neurônio e apresentar ação pós-sináptica. Ou seja, durante as sinapses, ao chegar um impulso nervoso, este deveria causar rapidamente a liberação de moléculas de neurotransmissores que se difundem, de forma breve, sobre a membrana de um neurônio adjacente, aumentando ou diminuindo a sua atividade elétrica [Valle, *et. al.*; 1991]. Mas, atualmente se sabe que os mediadores químicos presentes dentro do cérebro podem ter ações lentas e de longa duração, podendo chegar a minutos ou horas, ter um efeito

pulverizador e agirem a uma distância considerável de seu local de ação [Rang, *et al.*, 1997].

Nos últimos anos, foram obtidos progressos valiosos na caracterização de neurotransmissores, sua localização e elucidação dos eventos moleculares que os envolvem, mas muitos estudos ainda precisam ser realizados, para que seja possível o desenvolvimento de estratégias no tratamento de doenças neurodegenerativas e nos seus diagnósticos. Além disso, é preciso desenvolver métodos que permitam identificar e quantificar os neurotransmissores *in vivo* e *in vitro*.

Na **Figura 1.1** e nos próximos itens são apresentadas as principais características dos neurotransmissores avaliados neste trabalho, bem como sua classificação e estrutura química.

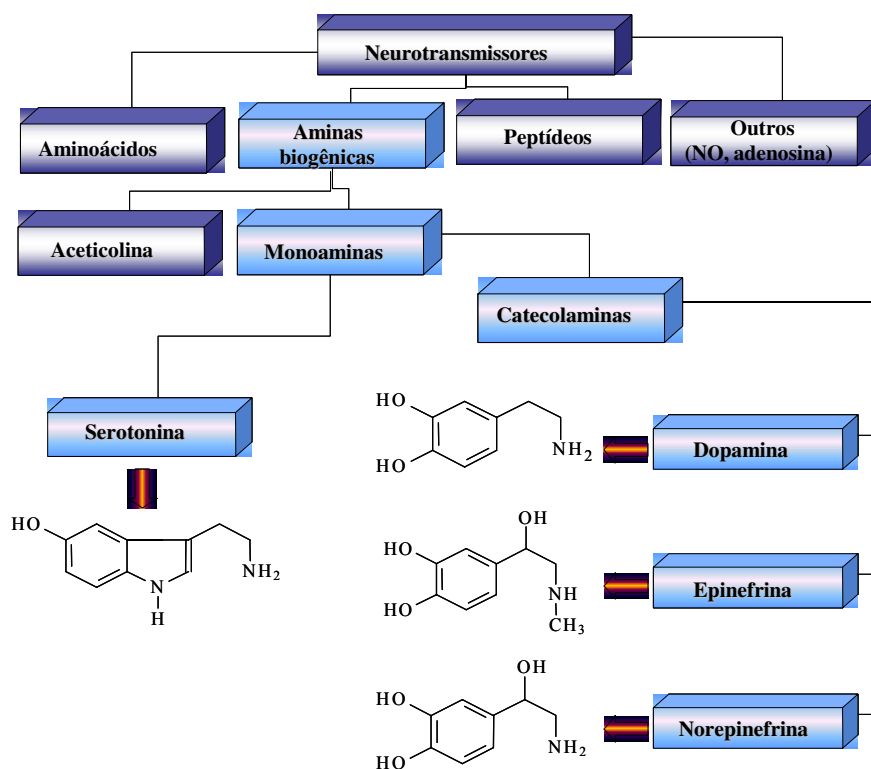


Figura 1.1 - Classificação de alguns neurotransmissores com respeito à sua função química.

A dopamina (DA) (2-(3,4-diidroxi-fenil)-etilamina) é uma catecolamina do grupo das aminas biogênicas encontrada no hipotálamo e em várias áreas do

SNC. Esta catecolamina é instável e sofre oxidação em soluções neutras e alcalinas na presença de oxigênio e de luz com a formação de dopaminocromo e outros compostos poliméricos [Rein, *et al.*, 2001; Carlsson, *et al.*, 1997].

A constatação de que a DA no cérebro é um neurotransmissor efetivo e não meramente um precursor da norepinefrina ocorreu em meados da década de 60. Esta década foi notável para a compreensão da função de diversos neurotransmissores, obtidos a partir de estudos nas áreas de neuroquímica e de neurofarmacologia, e ficou conhecida como “anos das monoaminas”. Nestes anos foram feitas muitas descobertas importantes sobre o papel dos neurotransmissores no SNC e sobre a capacidade de certas drogas influenciarem o sistema [Calbreath, 1992].

A síntese da DA segue a mesma via que a norepinefrina, isto é, a conversão da tirosina em dopa seguida de descarboxilação. É encontrada no sistema límbico, hipotálamo, entre outros, e as suas funções, de modo geral, dividem-se em: (a) controle motor (sistema nigrostriatal, responsável por 75% da DA no cérebro); (b) efeitos comportamentais e (c) controle endócrino.

O interesse na química redox da DA deve-se ao fato desta substância estar diretamente envolvida em processos de neurotransmissão e, conseqüentemente, relacionada com doenças neurodegenerativas, entre essas o Mal de Parkinson e Alzheimer.

A DA é indicada no tratamento de pacientes com desequilíbrio hemodinâmico, seja ele proveniente de choques, traumas, hemorragias e pós-operatórios, sendo veiculada em formulações injetáveis na forma de cloridrato de dopamina.

A serotonina (ST) é um neurotransmissor derivado do triptofano e, nos mamíferos, é sintetizada no cérebro e em outros tecidos como, por exemplo, no fígado. A mesma está largamente distribuída na natureza, sendo encontrada na maioria dos vertebrados e invertebrados, no veneno de vespas e escorpiões, e em vários frutos, tais como abacate, banana, berinjela, maracujá, tomate, abacaxi e outros [Zanini & Oga, 1994].

Os neurotransmissores podem ser inibitórios ou excitatórios, sendo a ST um neurotransmissor excitatório. No SNC, ela está relacionada com a temperatura corporal, percepção sensorial, sono e controle hormonal. Interfere na fisiopatologia de distúrbios afetivos, estados hiperagressivos e na depressão. Foi sugerida sua participação também nas disfunções mentais, principalmente a esquizofrenia [Valle, *et al.*, 1991]. Em estudos sobre o envelhecimento humano, a ST tem sido estudada em conjunto com os demais neurotransmissores nas funções de memória, pensamento, emoção e comportamento. Uma das explicações para a depressão é a diminuição no nível de ST, que resulta em um humor reprimido [Cohen, 1995].

Os níveis normais de ST no organismo estão entre 0,5 e 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que valores acima destes podem indicar a presença de carcinomas.

A norepinefrina (NEP), também denominada de noradrenalina, é um neurotransmissor do sistema nervoso autônomo simpático e do SNC. No SNC, encontra-se no córtex cerebral, sistema límbico, hipotálamo, cerebelo e medula espinhal. A sua biossíntese é feita a partir do aminoácido tirosina [Rang, *et al.*, 1997]. A maior parte da NEP encontrada em terminais nervosos fica contida em pequenas vesículas situadas nos axônios dos neurônios e apenas uma pequena parte permanece, em condições normais, livre no citoplasma.

A NEP interfere no ritmo sono/vigília, emoção, aprendizagem, controle da temperatura, entre outros. A sua concentração plasmática em adultos está entre 0,3 e 1,7 nmol L^{-1} . Alterações do nível de concentração levam a diversos distúrbios, entre eles a depressão.

A epinefrina (EP) é uma catecolamina liberada pela medula supra-renal. Na sua biossíntese, a feniletanolamina-N-metiltransferase catalisa a N-metilação da NEP. A principal localização desta enzima é a medula supra-renal, que contém células que liberam a NEP. Em um adulto, a sua concentração normal no plasma sanguíneo é menor que 0,5 nmol L^{-1} . A estimulação das medulas supra-renais pelos nervos simpáticos tem como consequência a liberação de grandes quantidades de EP que passa à circulação sistêmica e distribuição no organismo. Durante períodos de estresse, quando o sistema nervoso simpático é excitado, a

EP secretada pela medula supra-renal causa um grande aumento, tanto na glicemia quanto na concentração sanguínea de ácidos graxos. Quantitativamente, o aumento de ácidos graxos é muito maior que o aumento da glicemia. Por conseguinte, a EP aumenta especialmente a utilização da gordura em estados de estresse como os exercícios físicos, o choque circulatório, a ansiedade e assim por diante. Uma outra propriedade da EP é aumentar a atividade cardíaca e causar ligeira constrição dos vasos sanguíneos dos músculos. Porém, como os vasos musculares representam uma parte considerável de todos os vasos do corpo, a EP eleva a pressão arterial, mas eleva muito mais o débito cardíaco, pela ação que exerce sobre o coração e as veias [Guyton, 1986].

2. Influência de íons metálicos no comportamento de neurotransmissores

Estudos recentes têm mostrado que, alguns metais de transição como cobre, zinco e ferro, assim como determinados neurotransmissores parecem estar envolvidos nas doenças neurodegenerativas, como Mal de Parkinson, Alzheimer, nas doenças de Menkes, Wilson, Pick, derrame cerebral e isquemia.

O cobre (Cu(II)) é um elemento traço envolvido em muitos processos biológicos importantes e mudanças nos seus níveis de concentração levam a uma variedade de patologias clínicas. Em particular, podem ser destacadas as mutações que resultam na Síndrome de Menkes (deficiência de Cu(II)), e doença de Wilson (toxicidade por Cu(II)) [DiDonato & Sarkar, 1997; Saito, *et al.*, 1999]. Nesta última doença o acúmulo de Cu(II) leva a patologia hepática e sintomas neurológicos como os sinais de Parkisonismo e distonia. *In vitro*, observa-se que o Cu(II) causa a despolarização de neurônios e bloqueia os canais de Na⁺ e K⁺ nos axônios.

Em estudos para avaliar a função de íons metálicos de transição divalentes sob terminais catecolaminérgicos nervosos, Wang e Walcarus (1996)

observaram fortes efeitos de alguns íons sobre a liberação de catecolaminas. Estas observações confirmam outros resultados descritos na literatura, onde foi verificado que tanto na deficiência quanto no excesso do Cu(II) causam mudanças nos níveis de concentração de neurotransmissores em diferentes regiões do cérebro [Prohaska & Bailey, 1993; Prohaska & Bailey, 1994].

O zinco (Zn(II)) é distribuído no cérebro de forma heterogênea. É detectado principalmente nos neurônios glutamatérgicos, nos terminais nervosos do hipocampo e, particularmente, em altas concentrações no bulbo olfatório [Lobner, *et al.*, 2000; Sayre, *et al.*, 2000; Lee, *et al.*, 2000]. Quando localizado nos terminais sinápticos, o zinco, assim como o cobre, pode ser liberado pela despolarização de membrana, podendo alcançar concentrações sináptica/extracelular de $10 - 300 \mu\text{mol L}^{-1}$ [Assaf & Chung, 1984; Frederickson, 1989; Kardos, *et al.*, 1989; Aklirezaei, *et al.*, 1999]. Existem evidências que o zinco também possui um papel modulador da transmissão sináptica.

O Zn(II) também é descrito como componente neuropatológico em doenças como Mal de Alzheimer, Menkes, Wilson, Pick, derrame cerebral e isquemia [Cuajungco, *et al.*, 1997; Frederickson, *et al.*, 1989; Koh, *et al.*, 1996; Tumer & Horn, 1997]. Embora, muitos mecanismos tenham sido propostos, a base para estas patologias induzidas por metais de transição continua sob investigação.

Além do cobre e zinco, outro metal de transição bastante importante do ponto de vista biológico é o ferro, sendo o metal mais abundante no corpo humano. O ferro pode existir nas valências (+2) e (+3), sendo que o estado de oxidação é essencial na ação biológica de transporte de oxigênio e reações redox, particularmente na respiração celular. O elemento tem importância também na bioquímica celular, onde é usado na síntese de DNA e proteínas e está envolvido como co-fator de numerosas enzimas, respostas fisiológicas e outros. Uma vasta literatura já foi publicada sobre várias funções e disfunções devido à deficiência de ferro [Youdin, *et al.*, 1989; Connor & Benkovic, 1992; Connor, *et al.*, 1995; Gorell, *et al.*, 1995; van Rensburg, *et al.*, 1995; Felt & Telosoff, 1996; Rao, *et al.*, 1999; Youdin, 2000]. Entre estes problemas, podem ser destacados: o declínio no nível da capacidade cognitiva, os problemas de audição, os problemas no sistema

endocrinológico e imunológico. Um trabalho desenvolvido por deUngria e colaboradores [deUngria, *et al.*, 2000], relata que a deficiência de ferro em ratos pode reduzir a atividade metabólica em certas áreas do cérebro relacionadas à memória.

A deficiência de ferro é um problema comum e, em crianças, pode causar deficiências neurológicas. Por outro lado, ferro em excesso nas células é extremamente tóxico. Alterações dos níveis de concentração de ferro implicam em diversas doenças no ser humano, incluindo doenças neurodegenerativas, arteriosclerose, câncer e infecções microbianas. Nas doenças neurodegenerativas, o ferro parece estar relacionado com o aumento anormal do *stress* oxidativo induzido e sugere que o elemento está envolvido na morte de neurônios [Qian, *et al.*, 1997].

Até 1974 a literatura não dava atenção para o metabolismo e função do ferro no cérebro. Mas, na década de 1980 observou-se um crescente interesse pelo estudo desse metal, tanto nas conseqüências relacionadas à sua deficiência, como ao seu acúmulo e seu envolvimento na neurodegeneração e doenças progressivamente neurodegenerativas.

Estudos mostraram que o Fe(II) aumenta a velocidade de oxidação de monoaminas como a ST e a DA e que os produtos da oxidação se ligam covalentemente com grupos sulfidrílicos de proteínas. Logo, o íon Fe(II) pode aumentar a citotoxicidade da DA meramente por aumentar a velocidade de oxidação e pode, em parte, ser a causa da destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos. O mecanismo pelo qual essas reações se processam ainda não foi totalmente esclarecido.

Na presença de DA avaliou-se que, a produção de $\cdot\text{OH}$ *in vivo* mediada por Fe(II) pode ser aumentada de maneira dependente [Nappi & Vass, 1998]. Isto sugere que as interações catecolamina-ferro podem contribuir para a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos observados em algumas doenças neurodegenerativas. É interessante notar que a DA pode ter um papel importante como um quelante do ferro (**Figura 1.2**).

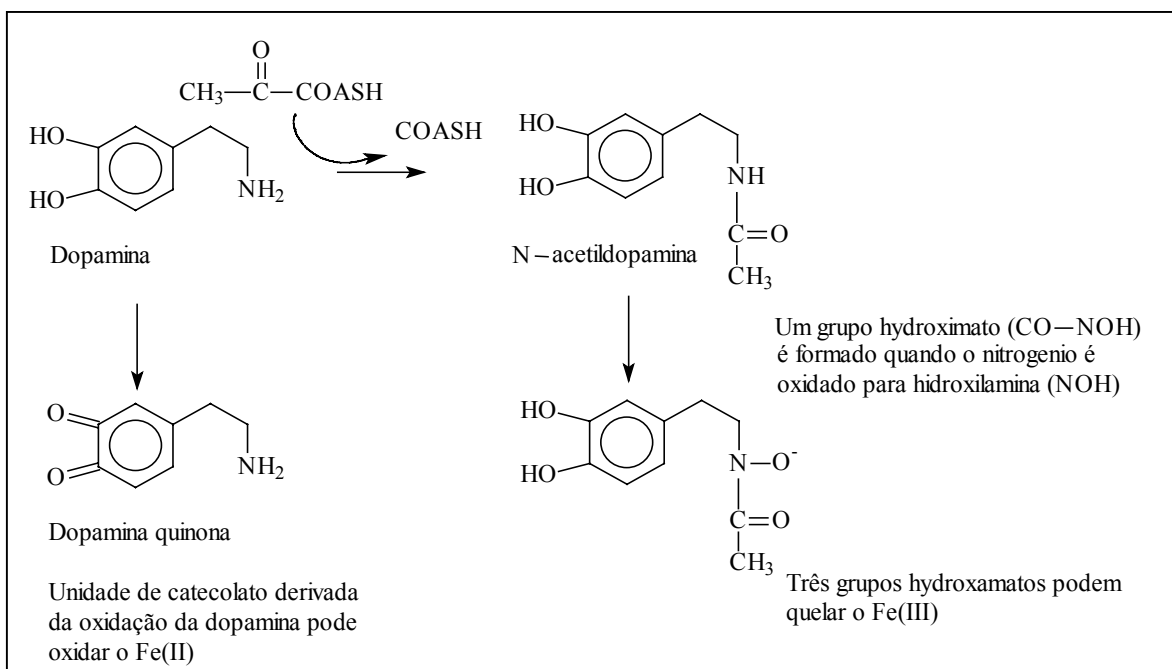


Figura 1.2 – Diagrama dos caminhos de reações pela qual grupos catecolatos e hidroximatos podem interagir com ferro [Nappi & Vass, 1998].

Dados da literatura demonstram que íons de ferro, cobre e zinco podem formar complexos com catecolaminas, podendo levar a oxidação das mesmas [Kiss & Gergely, 1979; El-Ayaan, *et al.*, 1997; Jewett, *et al.*, 1997; Gerard & Ghehhal, 1997]. Se estas reações forem passíveis de ocorrer em dadas regiões do cérebro, poderia ser um outro mecanismo onde estes metais de transição estariam agindo diretamente. Desta forma o mecanismo de oxidação/hidroxilação do radical hidroxila poderia ser basicamente diferente da reação de Fenton.

O estudo feito por El-Ayaan (1997) e colaboradores mostra que o ferro (III) reage reversivelmente com a DA em condições anaeróbicas formando um complexo instável 1:1 (metal/DA). O complexo formado é decomposto produzindo ferro(II) e uma semiquinona. Contudo, é relatado na literatura que, ferro, zinco e cobre podem formar complexos do tipo 1:2 e 1:3 com catecolaminas. Isto indica que as reações de formação destes complexos necessitam de um estudo mais detalhado para que seus mecanismos possam ser entendidos.

Em trabalhos anteriores foi verificado que além do Fe(III) o Hg(II) também catalisa a oxidação da DA [Winter, 2003]. A partir da literatura sabe-se que o

HgCl₂ além de ser neurotóxico, influencia o processo de neurotransmissão, levando a um aumento da concentração de DA nos tecidos do *striatum* [Faro, *et al.*, 2001]. Ainda, foi verificado que determinados compostos carboxilatos interagem com neurotransmissores que apresentam em sua estrutura um grupo catecol [Carvalho, *et al.*, 2003; Winter, *et al.*, 2003]. Enquanto os metais de transição catalisam a oxidação da DA, os carboxilatos tendem a inibir ou retardar o processo de oxidação/degradação desses neurotransmissores. Esses resultados são importantes dos pontos de vista biológico e químico, uma vez que podem auxiliar na compreensão do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, bem como permitir o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de neurotransmissores, assim como outros compostos fenólicos.

3. Interação entre carboxilatos e neurotransmissores

Estudos anteriores mostraram que o EDTA inibe o processo de passivação de eletrodos sólidos em medidas eletroquímicas causado pela polimerização de compostos fenólicos tal como a DA. Além disso, observou-se também que este neurotransmissor sofre oxidação em menor valor de potencial quando compostos carboxílicos como EDTA e citrato estão presentes em solução. Finalmente, estes estudos ainda revelaram que a interação da DA com compostos carboxílicos é dependente do número de grupos carboxílicos presente na molécula, sendo que compostos com 3 grupos carboxílicos apresentaram maior interação com a DA [Carvalho, *et al.*, 2003; Winter, *et al.*, 2003].

Poucos estudos descrevendo a interação de carboxilatos com aminas biogênicas foram encontrados na literatura até o final de 2006. Apesar da literatura citar trabalhos sobre aminas biogênicas na presença de carboxilatos, esses são, na sua maioria, resultados de pesquisas propondo métodos para a determinação desses compostos por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que o carboxilato é utilizado apenas como componente da fase móvel [Leung & Tsao, 1992; Fotopoulou & Ioannou, 2002].

Um carboxilato bastante estudado foi o ascorbato, principalmente por ser um interferente potencial na determinação eletroquímica de DA, uma vez que seu potencial de oxidação é muito próximo ao potencial da DA, além de ser encontrado em altas concentrações nos fluidos biológicos [Wang & Walcarius, 1996; Zhang & Jeon, 2002]. Foi verificado que o ascorbato é um elemento essencial para a neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina, pois quando este se encontra na presença de agentes redutores sua ação neurotóxica é reduzida [Álvarez, *et al.*, 2001]. Entretanto, este estudo não propõe possíveis mecanismos de interação entre o ascorbato e neurotransmissores.

Outros estudos relatam a interação de carboxilatos e aminas biogênicas alifáticas, onde foi verificada a estabilidade de carga e estabilidade da estrutura do complexo formado, mas estes estudos não foram relacionados a aminas aromáticas [Stefano, *et al.*, 1998; Robertis, *et al.*, 2001a; Robertis, *et al.*, 2001b].

Além da inibição do processo de polimerização de compostos fenólicos em eletrodos sólidos pelo EDTA como foi discutido anteriormente, foi verificado que o citrato e outros carboxilatos podem exercer esse papel [Winter, *et al.*, 2006]. Em particular, a interação da DA pré-oxidada em varredura cíclica, interage com o citrato formando um novo composto eletroativo indicado pelo par redox na **Figura 1.3**.

Um estudo semelhante entre o comportamento eletroquímico da DA e outras aminas biogênicas revelou que para ocorrer a interação entre a amina biogênica e o composto carboxílico, a amina biogênica necessita de prévia oxidação, e precisa ter um grupo catecol em sua estrutura. A interação entre a DA e carboxilatos foi estudada também por espectrofotometria na presença de metais, onde se verificou que alguns metais atuam como agentes oxidantes, corroborando com dados encontrados na literatura. Através dos estudos eletroquímicos, foi possível propor uma hipótese para o mecanismo eletroquímico envolvido para a DA na presença de citrato no eletrodo de mercúrio (**Figura 1.4**). No entanto, uma vez que os produtos intermediários do processo eletroquímico não podem ser isolados devido a sua instabilidade, é necessário o emprego de outras técnicas para confirmar essa hipótese.

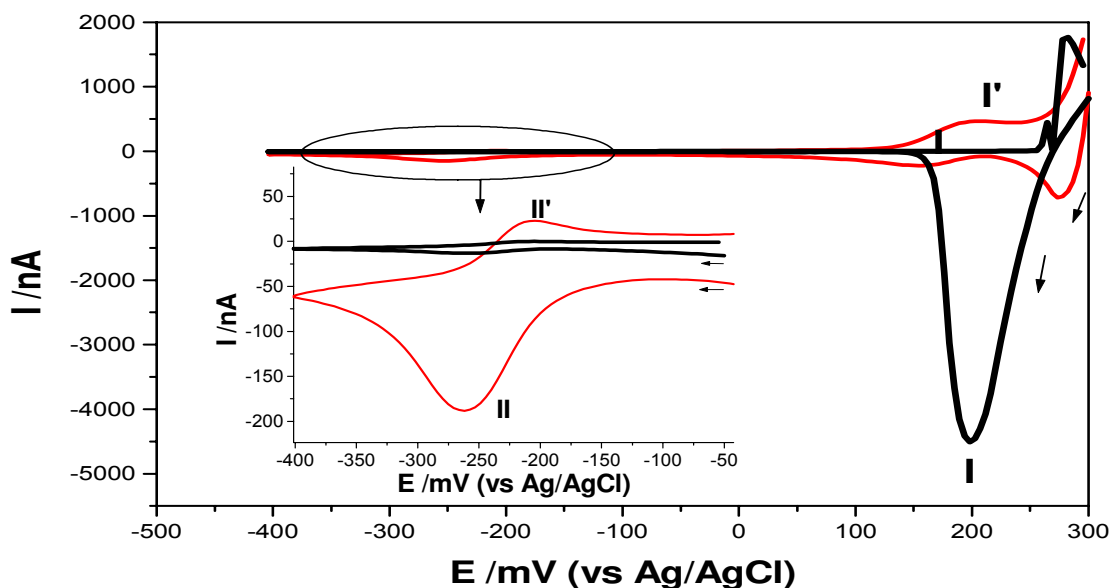


Figura 1.3 – Voltamograma cíclico obtido para dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. v : 20 mV s^{-1} , E_i : $+300 \text{ mV}$, E_{inv} : -400 mV e E_f : $+300 \text{ mV}$.

Neste sentido a espectroeletroquímica (SEC) é uma técnica potencial para este estudo pois permite a obtenção simultânea da curva de corrente x voltagem e do espectro UV/Vis.

Como os carboxilatos estão sempre presentes, seja em nosso organismo ou em nossa alimentação, tanto na ausência como na presença de íons metálicos, se faz necessário verificar quais carboxilatos podem vir a interferir nesses mecanismos e de que forma isso ocorre, para que assim se possa entender um pouco mais sobre os mecanismos neuroquímicos tão complexos e fascinantes.

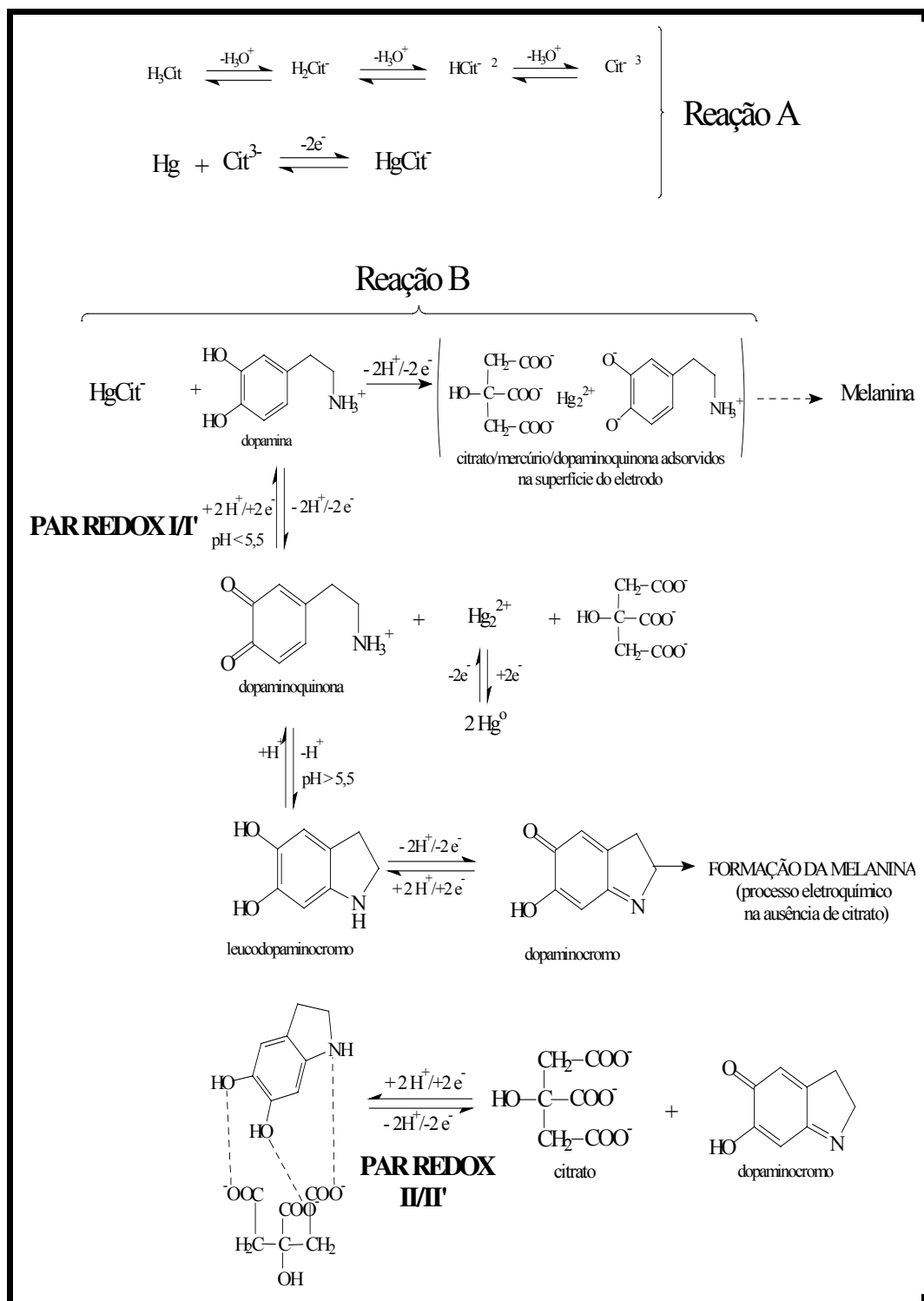


Figura 1.4 - Mecanismo proposto o comportamento eletroquímico da dopamina na presença e ausência de citrato no eletrodo de mercúrio [Winter, *et al.*, 2006].

4. Espectroeletroquímica

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento no interesse em estudar processos que ocorrem no eletrodo de sistemas que não se limitam aos parâmetros usuais da eletroquímica, como corrente, carga e potencial [Bard & Faulkner, 2001]. A química eletroanalítica apresenta uma ampla possibilidade de técnicas quantitativas, entre as quais se destacam as técnicas voltamétricas e potenciométricas [Brett & Brett, 1993], por combinarem seletividade, rapidez e sensibilidade com baixo custo e facilidade de miniaturização. Contudo, quando se trata de elucidar os processos que ocorrem na superfície do eletrodo, as técnicas eletroquímicas nem sempre são suficientes, motivo este que impulsionou o desenvolvimento e utilização de técnicas complementares, como a combinação da técnica eletroquímica com as espectroscópicas. Essa combinação de técnicas vem facilitar os estudos dos processos eletroquímicos que ocorrem na superfície dos eletrodos, combinação esta denominada de espectroeletroquímica (SEC, *Spectroelectrochemistry*), onde as medidas espectroscópicas são realizadas na própria célula eletroquímica [Bard & Faulkner, 2001; Kuwana, *et al.*, 1964].

A utilização da SEC apresenta a vantagem da rápida correlação entre os dados eletroquímicos e espectroscópicos obtidos simultaneamente. Normalmente, durante a realização dos experimentos, as medidas espectroscópicas vão se alterando com a mudança das espécies eletrogeradas na camada de difusão, seja por sua formação ou consumo [Wang, 2000]. A correlação de informações espectroscópicas e eletroquímicas amplia as possibilidades de elucidação de processos do eletrodo. Ainda, a SEC viabiliza o estudo de compostos intermediários instáveis, que muitas vezes não são possíveis de serem isolados e caracterizados.

Diferentes técnicas espectroscópicas têm sido associadas a técnicas eletroquímicas. A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV), visível (Vis) e infravermelho (IR) são as mais frequentemente utilizadas, por dependerem da instrumentação mais acessível, serem de fácil implementação e propiciarem o monitoramento de baixas concentrações com seletividade de

espécies eletrolisadas na interface eletrodo/solução [Heineman, 1978]. A espectrofotometria de absorção pode ser implementada em um dos três modos:

- a) Transmissão, que envolve a passagem do feixe óptico diretamente pelo eletrodo opticamente transparente e/ou pela solução adjacente;
- b) Refletância especular, onde o feixe óptico atravessa a solução e é refletido pela superfície do eletrodo;
- c) Refletância interna, onde o feixe óptico atravessa um eletrodo opticamente transparente é refletido pela solução em um ângulo maior que o ângulo crítico de forma a ser totalmente refletido.

Técnicas como a luminescência e espectroscopia de espalhamento, também foram combinadas à eletroquímica. Em Raman e Raman ressonante há a excitação direta da solução por feixe de laser, sendo observado o espalhamento provocado (espectro Raman). Um aspecto particularmente importante da técnica é a informação estrutural contida no espectro Raman [Jeanmaire, *et al.*, 1975; Holze, 1993; Müller, *et al.*, 2000]. O feixe óptico usado para excitação também pode resultar em fluorescência. Uma grande variedade de reações no eletrodo pode também pode ser acompanhada pela emissão de luz como resultado da quimiluminescência eletrogerada [Bard & Faulkner, 1997].

A SEC encontrou diversas aplicações, destacando-se entre outras: a elucidação de mecanismos de reação [Holze & Malinauskas, 1999; Wang, *et al.*, 1999; Ma, *et al.* 1999; Babaei & McQuillan, 1998], a determinação da cinética de reações [Owens & Dryhurst, 1977; Owens, *et al.*, 1978; Niu & Dong, 1993; Tam, *et al.*, 1997], o estudo da estequiometria de reações [Kuwana & Heineman, 1976], a obtenção de espectros de intermediários de vida curta [Büschel, *et al.*, 2000; Kim, *et al.*, 2000], a determinação de potenciais de oxi-redução e de número de elétrons transferidos [Pinkerton, *et al.*, 1980; Powell & Wightman, 1997; Spreitzer, *et al.*, 1997], a caracterização do estado de valência misto de heteropoliânions [Sun, *et al.*, 1998], o estudo de fenômenos de superfície [Nekrasov, *et al.*, 2000; Borrás, *et al.*, 2000] e a investigação do dicróismo elétrico de moléculas [Zhu, *et al.*, 1998].

4.1. Eletrodos opticamente transparentes (OTE)

Em uma primeira fase de desenvolvimento da técnica SEC, grande parte das celas utilizava a espectrofotometria como técnicas de detecção e eram construídas com eletrodos opticamente transparentes (OTE – *Optically Transparent Electrode*). A principal característica deste tipo de eletrodo encontra-se na propriedade de alta transparência óptica e baixa resistividade elétrica [Heineman, *et al.*, 1984], no entanto, poucos materiais reúnem estas duas características. Os OTE podem ser classificados em três classes principais: filmes, minigrades e os quimicamente modificados.

Os filmes podem ser metálicos (Pt, Au e Hg-Pt) ou semicondutores (SnO_2 , In_2O_3 e TiO_2) e são depositados sobre superfícies como vidro, plástico, quartzo e germânio, sendo que o substrato dependerá da região espectral de interesse. Os eletrodos de filmes podem apresentar transparência variável de 20 a 85% [Heineman, *et al.*, 1984; Heineman & Kuwana, 1971; Tyson & West, 1978].

Os eletrodos de minigrades (finas malhas metálicas com 100 a 200 fios por polegadas) mais comuns são feitos de Pt, Au, Ni, Ag, Cu, Hg-Ni e Hg-Au, e sua transparência varia entre 20 a 80% [Heineman, *et al.*, 1984; Heineman & Goelz, 1978; Petek, *et al.*, 1971]. Diferentemente dos filmes, as minigrades apresentam as duas faces expostas ao eletrólito e se comportam como microeletrodos nos instantes iniciais de experimentos rápidos para passar, em seguida, ao regime de difusão linear semi-infinita. Outra característica particular das minigrades é o fato de que a porcentagem de luz transmitida (ou transmitância) é constante em uma grande região do espectro (do ultravioleta até o infravermelho).

Os OTE quimicamente modificados são eletrodos convencionais, filmes ou minigrades, que sofreram algum tipo de modificação em sua superfície [Stargardt, *et al.*, 1978; Scott, *et al.*, 1980; Evans, *et al.*, 1975].

Além dos eletrodos anteriormente citados, um outro tipo de OTE usado na construção de celas SEC é o carbono vítreo reticulado [Torimura, *et al.*, 1998; Sorrels & DeWald, 1992; Flowers, *et al.*, 2002]. Uma fina fatia de um eletrodo de carbono vítreo reticulado apresenta um valor de transmitância comparável a de

uma minigrade (13 a 45%, para 100 poros por polegadas, e 0,5 a 1,2 mm de espessura). A porosidade deste eletrodo faz com que se alcance a eletrólise completa do analito em pouco tempo devido ao curto caminho difusional até a superfície do eletrodo.

Novos materiais para construção de OTE continuam a ser pesquisados [Zak, *et al.*, 2001; Stotter, *et al.*, 2002]. Um exemplo refere-se ao uso de eletrodo de diamante, que apresenta como principais características: ampla janela óptica (cerca de 50% de transparência na região de 300 a 900 nm e maiores acima de 1500 cm^{-1}), alta estabilidade em sistema aquoso e não aquoso, tanto sob polarização catódica quanto anódica e baixa resistividade elétrica [Stotter, *et al.*, 2003].

4.2. Celas espectroeletroquímicas

As primeiras celas SEC construídas possuíam camada de difusão adjacente ao eletrodo muito espessa e isto tornava o tempo de eletrólise elevado. Para minimizar este problema, o uso de celas de camada delgada fazendo uso de OTE foi aplicada, onde os caminhos ópticos das celas apresentam espessuras na ordem de décimos e até milésimos de centímetros. Estas celas, embora apresentem um tempo de eletrólise reduzido, devido ao seu pequeno caminho óptico só poderão ser aplicadas a substâncias com alta absorvidade molar ou quando estiverem em altas concentrações. Além dessa limitação, existia ainda o problema do arranjo do sistema de eletrodos, que na maioria dos casos impossibilitava um acurado controle de potencial [DeAngelis & Heineman, 1976]. Um exemplo de célula de camada delgada empregada na SEC está apresentado na **Figura 1.5**.

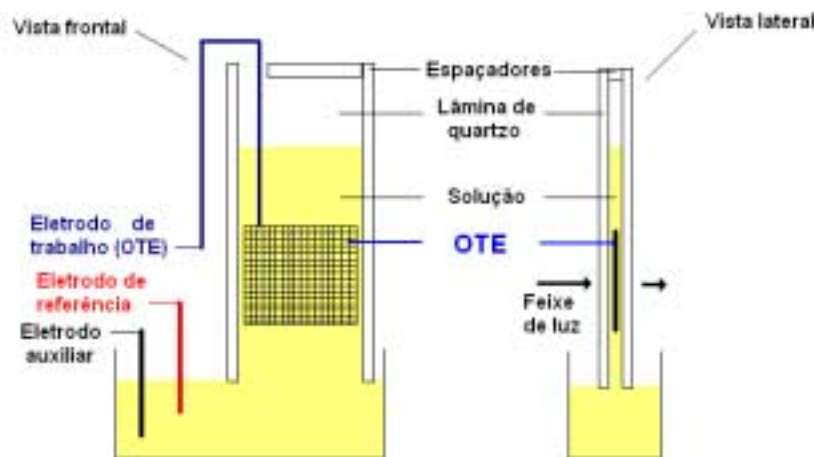


Figura 1.5 - Vista frontal e lateral de uma célula espectroeletroquímica em camada delgada que utiliza um eletrodo de minigrade metálico.

No final da década de 70 surgiu a primeira célula SEC de longo caminho óptico em camada delgada, onde o feixe atravessa a célula paralelamente à superfície do eletrodo. A elevação na sensibilidade da técnica, proporcionada pelo aumento do caminho óptico, permitiu sua aplicação a substâncias com menor absorvidade molar ou quando presentes em menor concentração. Outra vantagem que pode ser atribuída à técnica pela utilização deste tipo de célula é a obtenção de informações sobre a concentração das espécies eletrogeradas em função da distância até a superfície do eletrodo, ou seja, a resolução espacial da camada de difusão [Pruiksma & McCreery, 1979].

Esta nova célula abriu caminho para a utilização de materiais de eletrodo não transparentes e várias outras células de longo caminho óptico e camada delgada foram desenvolvidas [Dong, *et al.*, 1991; Xie, *et al.*, 1993; Heering & Hagen, 1994]. Algumas tratavam de dispositivos com dimensões bem superiores à de uma cubeta convencional de 1 cm de caminho óptico e embora possuíssem alta sensibilidade óptica [Zak, *et al.*, 1983], a difícil adaptação deste tipo de dispositivo a equipamentos comerciais fez com que se buscasse acomodar todos os componentes necessários dentro de cubetas convencionais. Sendo assim, se têm células de longo caminho óptico e camada delgada onde todos os dispositivos necessários para sua montagem foram confeccionados em blocos de Teflon e

posteriormente acomodados em cubetas convencionais em 1 cm de caminho óptico [Simone, *et al.*, 1982; Niu & Dong, 1995; Simmons & Porter, 1997].

Com o desenvolvimento da SEC, diversas celas foram desenvolvidas de acordo com as necessidades que os estudos apresentavam. Em 1983 ocorreu a construção da primeira célula espectrofluorovoltamétrica, montada em uma cubeta de quartzo fazendo o uso de um eletrodo de cobre [Rubim, & Gutz, 1985]. Seqüencialmente outras celas foram sendo desenvolvidas com o propósito de atribuir características específicas aos estudos realizados, como celas tubulares [Gueutin & Lexa, 1996; Kardash, *et al.*, 1999; Kirchhoff & Lee, 1993; Kirchhoff & Lee, 1994] e celas bidimensionais, com a obtenção de diferentes sinais espectroscópicos em um único experimento [López-Palácios, *et al.*, 2001; López-Palácios, *et al.*, 2002], surgindo assim a SEC bidimensional.

A predominância de celas estacionárias, observada principalmente na fase de desenvolvimento da técnica, foi pouco a pouco cedendo espaço para celas em fluxo. Para a espectrofotometria de absorção na região ultravioleta e do visível têm sido propostos modelos que fazem uso de OTE como de celas de longo caminho óptico de camada delgada adaptadas a cubetas convencionais. As celas em fluxo não só possibilitam a troca mais rápida e repetitiva das soluções investigadas, sem necessitar da desmontagem da célula, como abrem o caminho para a combinação com a metodologia da análise por injeção em fluxo (FIA – *Flow Injection Analysis*), ou seja, surge a espectroeletroanalítica em fluxo. A potencialidade da análise por injeção em fluxo na automação de procedimentos analíticos que precedem a determinação é bem conhecida, assim como a rapidez e repetibilidade nas operações, redução nas intervenções manuais envolvidas, redução nos riscos de contaminação e baixo consumo de amostras e reagentes [Wang, *et al.*, 1994; Flowers, *et al.*, 2002].

4.3. Espectroeletroquímica no estudo de neurotransmissores

Recentemente a SEC vem sendo aplicada também para estudo de reações envolvendo neurotransmissores.

Uma amina biogênica já estudada por espectroeletroquímica é a L-dopa, precursora da DA. Nesse estudo, Liu e colaboradores avaliaram, por meio da SEC e a voltametria, o comportamento da L-dopa. Para a realização dos estudos voltamétricos, os pesquisadores utilizaram um sistema de três eletrodos, sendo o carbono vítreo o eletrodo de trabalho. Para a realização dos estudos espectroeletroquímicos, foi feito o uso de um espectrofotômetro UV-Vis-NIR, utilizando uma célula em camada delgada com o feixe de radiação em paralelo construída no próprio laboratório. A célula foi construída inserindo duas peças de Teflon dentro de uma cubeta de quartzo de 1 cm. Como eletrólito suporte foram utilizados H_2SO_4 1 mol L^{-1} e tampão McIlvaine. Os autores sugeriram que o mecanismo da L-dopa em solução de pH neutro sobre o eletrodo de carbono vítreo é um processo eletroquímico irreversível seguido por uma lenta reação química de eletrooxidação do produto [Liu, *et al.*, 2003].

Outro trabalho utilizando a SEC foi desenvolvido por Robinson e colaboradores, que realizaram um estudo eletroquímico e espectroeletroquímico de filmes de melanina originados a partir de L-dopa. Para a realização dos estudos, dois sistemas de três eletrodos foram utilizados, sendo o eletrodo de trabalho de carbono vítreo para os estudos eletroquímicos e uma minigrade de platina para os estudos SEC. Os autores observaram que a melanina contém quinonas em sua estrutura, que são eletroativos, indicando que é possível obter polímeros condutores a partir da L-dopa, podendo ser aplicado para a imobilização de enzimas em biossensores [Robinson, *et al.*, 1998].

Outra amina biogênica estudada por SEC vem a ser a EP, onde a técnica é aplicada para avaliar o mecanismo de reações redox. Para a realização dos estudos, se fez uso de uma célula em camada delgada com feixe de radiação em paralelo, utilizando como eletrodo de trabalho o carbono vítreo. O eletrólito suporte foi KCl e tampão fosfato. Os estudos revelaram que o processo redox da EP

avaliada por SEC com o auxílio da voltametria cíclica é dependente das condições de pH do meio, da janela de potencial aplicada e do oxigênio dissolvido na solução. Verificou-se que a EP em pH 7,0 se oxida à adenocromo e em pH 3,0 a mesma se oxida à leucoadenocromo e posteriormente à adenocromo. No entanto, os autores deixam claro que essas informações foram obtidas a partir dos espectros e que a confirmação da identidade dos compostos ainda está sendo realizada [Cui, *et al.*, 2001].

Além da EP, a NEP também foi avaliada por SEC, onde seu comportamento eletroquímico e espectroeletroquímico foram avaliados em soluções alcalinas. Todos os estudos foram realizados utilizando como eletrodo de trabalho carbono vítreo e como eletrólito suporte NaOH e perclorato de sódio, pH 12. Por meio dos estudos realizados, os autores concluíram que a NEP apresenta um mecanismo de oxidação do tipo EE (reação eletroquímica – eletroquímica) quando encontra-se em pH 12, onde a reação ocorre nos dois grupos fenólicos (grupo catecol), mas não ficou evidente a ciclização para a formação de noradenocromo [Zhu, *et al.*, 1998].

Além dos neurotransmissores, medicamentos que visam o tratamento de doenças neurodegenerativas também foram avaliados por SEC. Assim sendo, foram realizados estudos com a L-dopa e dobutamina. A dobutamina foi avaliada utilizando eletrodo de carbono vítreo para os estudos eletroquímicos e eletrodo de platina para os estudos SEC. Seu comportamento foi avaliado em diversas condições, como por exemplo, solução de ácido sulfúrico com pH 1,2, tampão acetato pH 4,9 e tris-HCl-NaCl, pH 7,4. Foi verificado que a dobutamina apresenta reações eletroquímicas e químicas acopladas, revelando que a reação que ocorre na superfície do eletrodo é do tipo ECE (reação eletroquímica – química – eletroquímica). Em meio neutro, a polimerização dos produtos de oxidação ocorre mais facilmente [Yang, G. J.; *et al.*; 2004].

II. Objetivos

OBJETIVOS

Estudar a influência de compostos carboxílicos no processo de degradação de aminas biogênicas, na presença e ausência de íons metálicos, fazendo uso da espectroeletroquímica como principal ferramenta.

Os objetivos específicos foram:

- d) Construção e caracterização de uma cela espectroeletroquímica empregando um eletrodo minigrade de platina;
- e) Estudar as reações químicas entre íons metálicos e aminas biogênicas na ausência e presença de compostos carboxílicos mediante emprego da espectrofotometria UV-Vis e técnicas eletroquímicas;
- f) Avaliar o comportamento espectroeletroquímico de aminas biogênicas na presença de compostos carboxílicos e/ou de íons metálicos;
- g) Estabelecer possíveis mecanismos de reações para as interações estudadas.

III. Experimental

1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

1.1. Aminas biogênicas

As aminas biogênicas utilizadas neste estudo foram, dopamina, serotonina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa (**Figura 3.1**), todas de grau analítico (Aldrich). As soluções estoque de concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente pela dissolução dos compostos em água.

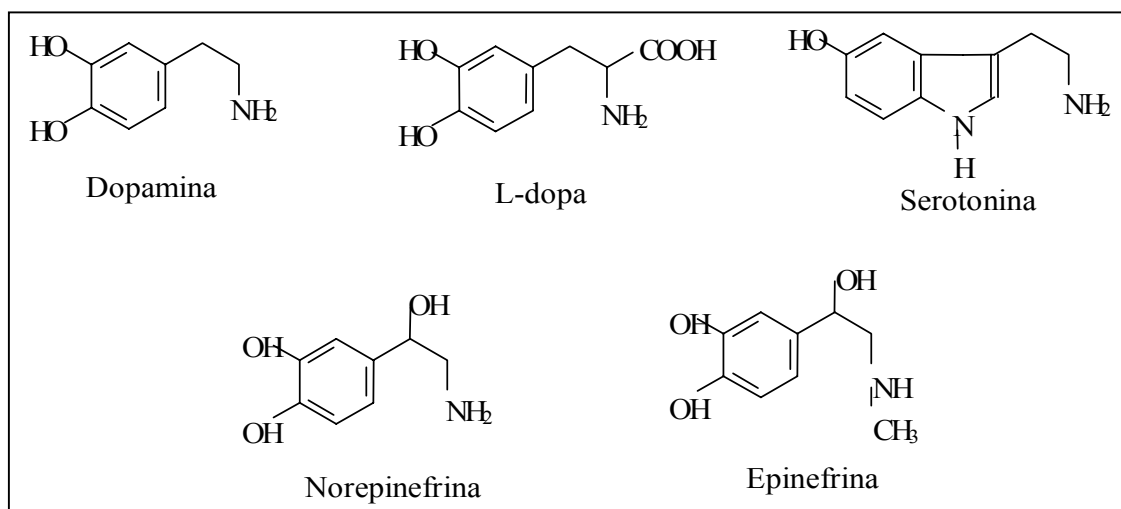


Figura 3.1 – Aminas biogênicas avaliadas.

1.2. Compostos Carboxílicos

Os compostos carboxílicos utilizados foram ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido etilenobis(oxietilenonitrilo) tetracético (EGTA), ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA) e ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (Aldrich), todos na forma de sais de sódio. As estruturas dos ácidos carboxílicos empregados estão apresentadas na **Figura 3.2**. As soluções estoque de concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente pela dissolução dos compostos em água.

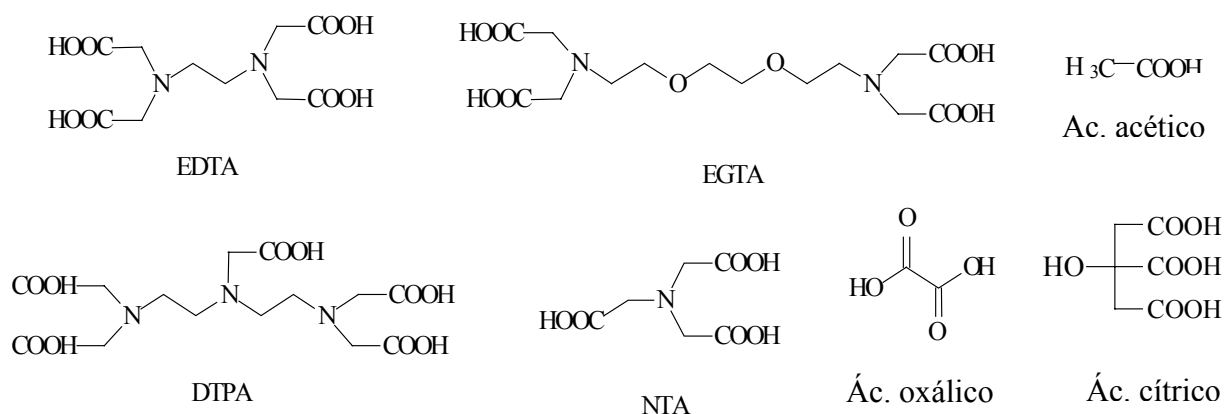


Figura 3.2 – Estruturas dos ácidos carboxílicos.

1.3. Íons metálicos

Os íons metálicos avaliados foram obtidos a partir dos seguintes sais: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, MnSO_4 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, todos de grau analítico (Merck). Soluções estoque de concentração $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente pela dissolução dos compostos em água levemente acidificada com a adição de ácido nítrico para evitar a hidrólise dos metais.

1.4. Eletrólitos suporte

O principal eletrólito suporte utilizado para as medidas voltamétricas foi nitrato de potássio (Merck), onde sua concentração variou entre 0,10 e 1,0 mol L⁻¹. Para alguns estudos foi utilizado tampão citrato, resultante da mistura do sal citrato de sódio (Merck) com ácido cítrico (Merck).

Para a correção de pH dos demais eletrólitos, onde o meio não se encontrava tamponado, foram utilizadas soluções de NaOH 0,01 mol L⁻¹ e HNO₃ 0,01 mol L⁻¹.

1.5. Solução de o-tolidina para caracterização do sistema espectroeletroquímico

Para caracterização do sistema espectroeletroquímico foi preparada uma solução de o-tolidina 1,2 10⁻⁴ mol L⁻¹ em 0,125 mol L⁻¹ de ácido acético (Merck) e 0,25 mol L⁻¹ de ácido perclórico (Merck). Primeiramente a o-tolidina foi pesada e adicionada em um balão volumétrico. Seqüencialmente foram adicionados os ácidos concentrados em uma quantidade suficiente para preparar a solução na concentração acima citada. Esta mistura foi colocada em um banho de ultra-som até completa dissolução da o-tolidina e, finalmente, completado o volume. A solução era preparada momentos antes de sua utilização.

1.6. Solução para caracterização do sistema eletroquímico

Para caracterização do sistema eletroquímico, duas soluções estoque de K₄[Fe(CN)₆] e K₃[Fe(CN)₆], ambas na concentração de 0,010 mol L⁻¹, foram preparadas em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ momentos antes de sua utilização.

1.7. Solução para limpeza do eletrodo de platina

Para a limpeza eletroquímica do eletrodo de platina foi preparada uma solução de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹.

Para a limpeza química da minigrade de platina foi preparada solução de água-régia (ácido clorídrico concentrado e ácido nítrico concentrado 3:1 v/v).

2. Instrumentação

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato-galvanostato AUTOLAB® PGSTAT30 (ECO CHEMIE B.V., Holanda), associado a um “stand” 663VA (Metrohm) com sistema de três eletrodos:

Eletrodo de trabalho: gota pendente de mercúrio (área: 0,52 mm²) ou disco de platina (ϕ : 2 mm);

Eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl_{sat.};

Eletrodo auxiliar: grafite pirolítico.

A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador (Dell) e através de um programa computacional GPES (AUTOLAB® ECO CHEMIE B. V., Holanda)

Os estudos espectrofotométricos foram realizados em um espectrofotômetro de duplo feixe UV 1601-PC (Shimadzu, Japão), com o auxílio de cubetas de quartzo com um caminho óptico de 1 cm. A aquisição dos dados e o gerenciamento do espectrofotômetro foram realizados por um microcomputador e através de um programa computacional UVPC (Shimadzu, Japão).

Para a determinação do pH das soluções foi utilizado um pHmetro (Digimed DM-20, Brasil).

Para os estudos espectroeletroquímicos, um potenciostato construído no laboratório e um espectrofotômetro de arranjo de diodos USB2000 (Ocean Optics, EUA) foram interfaceados a um computador Pentium 4 (processador Intel) por

meio de uma interface paralela PCL 711S Advantech (EUA) e uma porta USB, respectivamente. O esquema da instrumentação empregada está apresentado na Figura 3.3. Ambos os instrumentos foram simultaneamente controlados pelo computador através de um programa escrito em Visual Basic 6.0 (Microsoft, EUA).

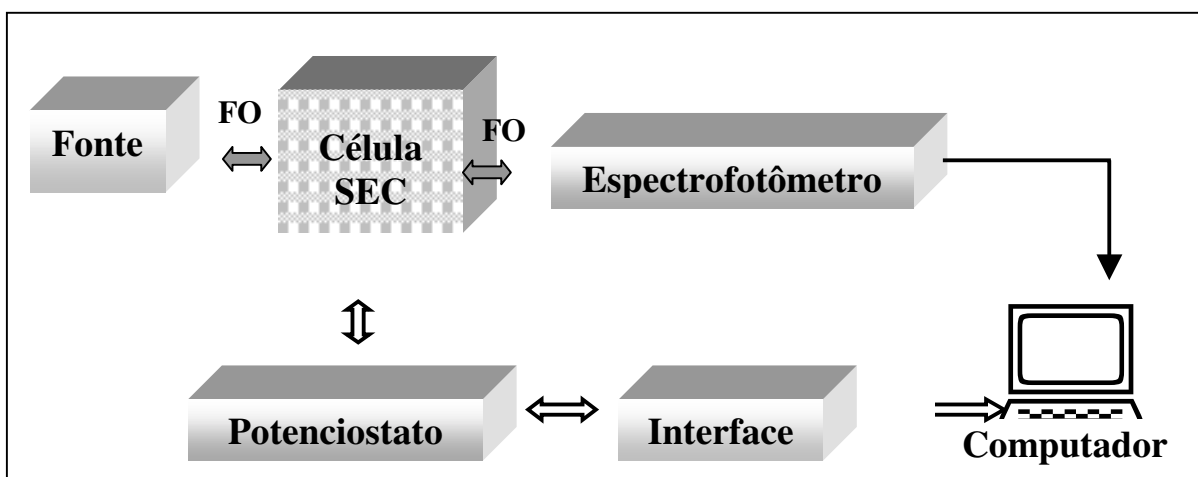


Figura 3.3 – Diagrama esquemático do sistema espectroeletroquímico. (FO: fibra ótica de quartzo).

A célula SEC foi construída em acrílico, apresentando um volume total de 3,7 mL, composta de dois compartimentos, como mostra a Figura 3.4. O primeiro compartimento localizado na parte superior da célula, em formato cilíndrico com um volume interno de 3,5 mL, foi utilizado para posicionar os eletrodos de referência (Ag/AgCl, KCl_{sat.}) e auxiliar (platina). O segundo compartimento, em formato retangular, localizado na parte inferior da célula, com capacidade de 200 µL, foi utilizado para posicionar o eletrodo de trabalho, composto por uma minigrade de platina (1024 mesh). Este compartimento apresenta duas janelas de quartzo pelas quais passa o feixe de luz perpendicularmente ao eletrodo de trabalho, com um caminho óptico de 1 mm. A introdução e remoção da solução de estudo na célula foi realizada com auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec, EUA). A remoção do oxigênio das soluções e as diluições dos analitos no eletrólito suporte foram realizadas no reator, ou seja, fora da célula SEC. O reator é

constituído de frasco de vidro (volume de 100 mL) com tampa em Teflon. O esquema do sistema utilizado está representado na **Figura 3.4**.

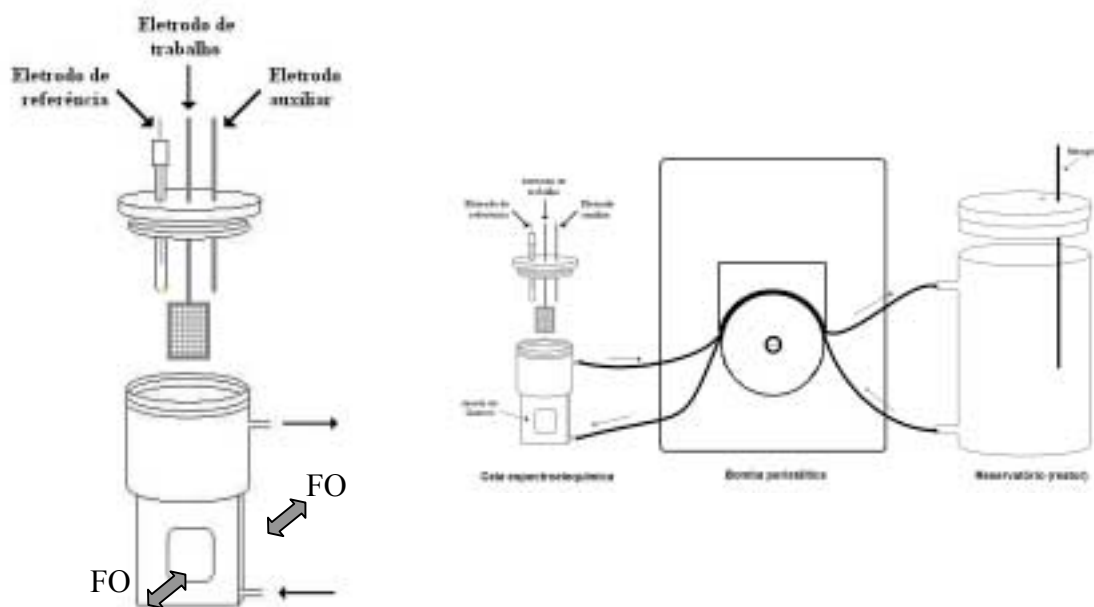


Figura 3.4 - Sistema empregado para obtenção dos dados espectroeletroquímicos, destacando a célula eletroquímica e os eletrodos, o reservatório para remoção de oxigênio e a bomba peristáltica para introdução e remoção da solução em estudo e lavagem da célula de medida. FO: fibra ótica.

A célula espectroeletroquímica foi mantida em um suporte de Teflon onde este apresentava dois orifícios alinhados para introdução da fibra ótica. O transporte da luz da fonte de radiação para a célula e desta ao detector foi realizado mediante uso de fibras óticas de quartzo de diâmetro de 1 mm.

3. Procedimentos

3.1. Medidas Eletroquímicas

O sistema utilizado nas medidas eletroquímicas era constituído de uma célula eletroquímica com três eletrodos e capacidade de 20 mL.

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma faixa de potencial entre +300 mV e -1000 mV para o eletrodo de gota pendente de mercúrio e entre +800 mV e -200 mV para o eletrodo de platina.

Anterior as medidas eletroquímicas, o eletrodo de platina foi submetido à limpeza mecânica com alumina vermelha 0,5 μm (Furlab, Brasil). Em seguida o eletrodo foi imerso em etanol (Reagen, Brasil) e levado ao banho de ultra-som 55 Hz (Unique Thorton, Brasil) por 1 min e posteriormente imerso em água e novamente levado ao banho de ultra-som por mais 1 min. Para finalizar, o eletrodo foi submetido a uma limpeza eletroquímica em ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹, por meio de varreduras sucessivas de potencial no intervalo entre -0,3 e 1,4 V, com velocidades de varredura de 10 a 0,10 V s⁻¹, até que os voltamogramas apresentassem o perfil característico da platina.

Em todos os estudos voltamétricos foram empregados KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ ou tampão citrato 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito suporte.

Os estudos de pH foram realizados em um intervalo entre 4,0 e 9,0 unidades de pH.

Os estudos da velocidade de varredura foram realizados entre 5 mV s⁻¹ e 750 mV s⁻¹.

Para a eliminação do oxigênio, o sistema foi purgado com gás nitrogênio 99,999% (White Martins) durante 300 s antes de iniciar o registro dos voltamogramas.

3.2. Estudo cinético da interação da dopamina na presença de carboxilatos e íons metálicos

Os estudos cinéticos da DA foram realizados em um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe Shimadzu (Japão). Os espectros, no intervalo de comprimento de onda entre 250 e 800 nm, foram registrados em períodos de 5 minutos por até 2 horas.

As condições experimentais foram: concentração da DA: $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, concentração dos íons metálicos Ce(IV), Fe(III), Zn(II) Mn(II), Cu(II) ou Hg(II): $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solvente: tampão citrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5 e KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo EDTA $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Os experimentos também foram conduzidos na ausência de EDTA. As soluções de íons metálicos foram preparadas a partir de sais de nitrato ou sulfato.

3.3. Estudos espectroeletroquímicos

Antes das medidas SEC, a solução contida no reator foi purgada com N_2 por um período de 300 s. A caracterização da célula SEC foi realizada com o auxílio de dois sistemas redox conhecidos: $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6])$ e *o*-tolidina. Estes sistemas foram empregados para avaliar parâmetros como potenciais padrão redox, comprimentos de onda no máximo de absorbância das bandas e a variação da espessura da camada de difusão do eletrodo em função da variação da velocidade de varredura.

Posteriormente, estudos com aminas biogênicas (DA, EP, ST, NEP e L-dopa) na presença e ausência de compostos carboxílicos (citrato, acetato, EDTA, EGTA, NTA e DTPA) foram realizados no intervalo entre pH 3 e 9.

Para a realização das medidas, 30 mL do eletrólito suporte foram inicialmente adicionados no reator e esta solução foi deaerada com N_2 por 5 minutos. Na sequência, a solução contida no reator foi bombeada para a célula de

medida, tomando-se os devidos cuidados para evitar a formação de bolhas na superfície dos eletrodos. Posteriormente o fluxo do eletrólito suporte foi cessado e o voltamograma e os espectros de absorção foram simultaneamente registrados.

Em seguida, foi adicionada a solução amostra no reator e realizada a sua deaeração por 30 segundos. A solução do reator foi bombeada para a célula e os dados analíticos obtidos (voltamograma e espectro).

A varredura de potencial foi realizada na faixa entre $-0,2$ e $0,8$ V utilizando a voltametria cíclica e o espectro foi obtido entre 190 e 890 nm, com uma resolução de 0,68 nm. Um espectro foi obtido a cada nova mudança de potencial. Assim, para uma varredura cíclica de potencial entre $-0,2$ e $0,8$ V foi obtido um espectro a cada degrau de potencial (10 mV). Cabe destacar que o tempo de obtenção de cada espectro é de aproximadamente 0,18 s.

O branco nos procedimentos espectroeletroquímicos foi realizado utilizando apenas o eletrólito de suporte.

Os espectros e voltamogramas foram obtidos de forma simultânea com o auxílio do programa escrito em Visual Basic (Microsoft) e os arquivos tipo ASC II gerados foram posteriormente tratados empregando programa Origin 6.1 (Microcal).

IV. Resultados e Discussão

1. Construção e caracterização do sistema espectroeletroquímico

Com o intuito de agregar maiores informações em relação aos mecanismos das reações envolvendo aminas biogênicas e compostos carboxílicos foi escolhida como principal técnica analítica a SEC, principalmente devido a sua capacidade de obter espectros de absorção dos compostos em estudo simultaneamente ao processo redox que ocorre na superfície do eletrodo. Para tal, foi necessário desenvolver o sistema para as medidas espectroeletroquímicas, o qual foi caracterizado empregando-se solução de hexacianeto férrico e ferroso e *o*-tolidina.

1.1. Caracterização eletroquímica da cela SEC

A avaliação das características eletroquímicas do sistema SEC, apresentada na parte experimental, item 3.3., pág. 34, foi feita pela comparação dos voltamogramas cíclicos do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ obtido na cela desenvolvida com uma cela eletroquímica convencional de um único compartimento. Foi avaliado o ΔE_p para o sistema em diferentes velocidades de varredura em meio de KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 - Comparação do ΔE_p de um sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $0,01 \text{ mol/L}^{-1}$ para uma cela convencional e a cela espectroeletroquímica.

Velocidade de varredura (mV s^{-1})	ΔE_p Cela convencional (mV)	ΔE_p Cela SEC (mV)
250	85	201
70	67	151
20	47	82
5	38	65
2	35	45

Por meio dos dados da **Tabela 4.1** é possível verificar que o ΔE_p é maior na cela SEC do que na cela convencional em todas as velocidades de varredura avaliadas, indicando um aumento da resistência, originário da queda ôhmica, mesmo trabalhando com um eletrólito suporte com elevada concentração (KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$). O aumento da resistência é decorrente do aumento da distância entre o do eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. No entanto, para baixas velocidades de varredura esse efeito é minimizado e uma vez que normalmente se trabalha com velocidades de varredura menores do que 5 mV s^{-1} para que a espessura da camada de difusão seja máxima, esta diferença de potencial pode ser considerada pouco significativa.

Foi avaliada posteriormente a influência da força iônica para três diferentes níveis de concentração de nitrato de potássio ($0,10$, $0,50$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) no potencial e corrente de pico. Foi verificado que ocorre um aumento de ΔE_p e diminuição da corrente de pico para concentrações menores que $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 (**Figura 4.1**). Portanto, para os estudos subseqüentes uma concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 foi empregada.

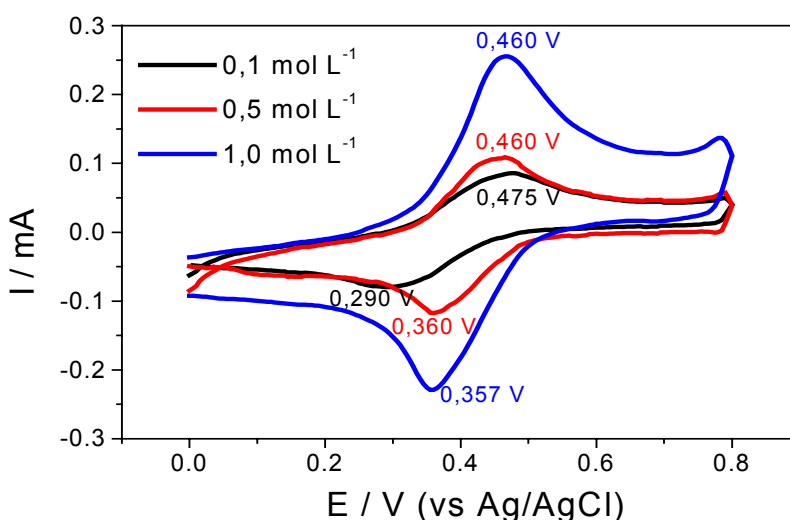


Figura 4.1 - Voltamogramas cíclicos para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $0,010 \text{ mol/L}^{-1}$ de diferentes concentrações de eletrólito suporte (KNO_3) obtidos para célula SEC. E_i : 0 V ; E_{inv} : $0,80 \text{ V}$; E_f : 0 V ; pH: $3,0$; v : 10 mV s^{-1} .

1.2. Caracterização espectroeletroquímica da cela

Após avaliar o comportamento eletroquímico da cela, foi necessário avaliar o comportamento espectroscópico do sistema durante a varredura de potencial. Para tal, foi utilizado como padrão a *o*-tolidina, composto este que apresenta um comportamento eletroquímico reversível e seu produto de oxidação, de cor amarela, apresenta alta absorvidade molar. O principal fator avaliado foi a influência da velocidade de varredura sobre a intensidade de absorção, pois é esta que determina a espessura da camada de difusão.

Foi verificado que por menor que seja o caminho óptico (1 mm), este ainda é muito maior que a espessura da camada de difusão. Portanto, quanto menor a velocidade de varredura, mais a camada de difusão se aproxima da espessura da célula até que esta seja limitada pelas paredes internas da mesma, podendo-se alcançar conversão quase que completa da *o*-tolidina conforme apresentado na reação da **Figura 4.2b**.

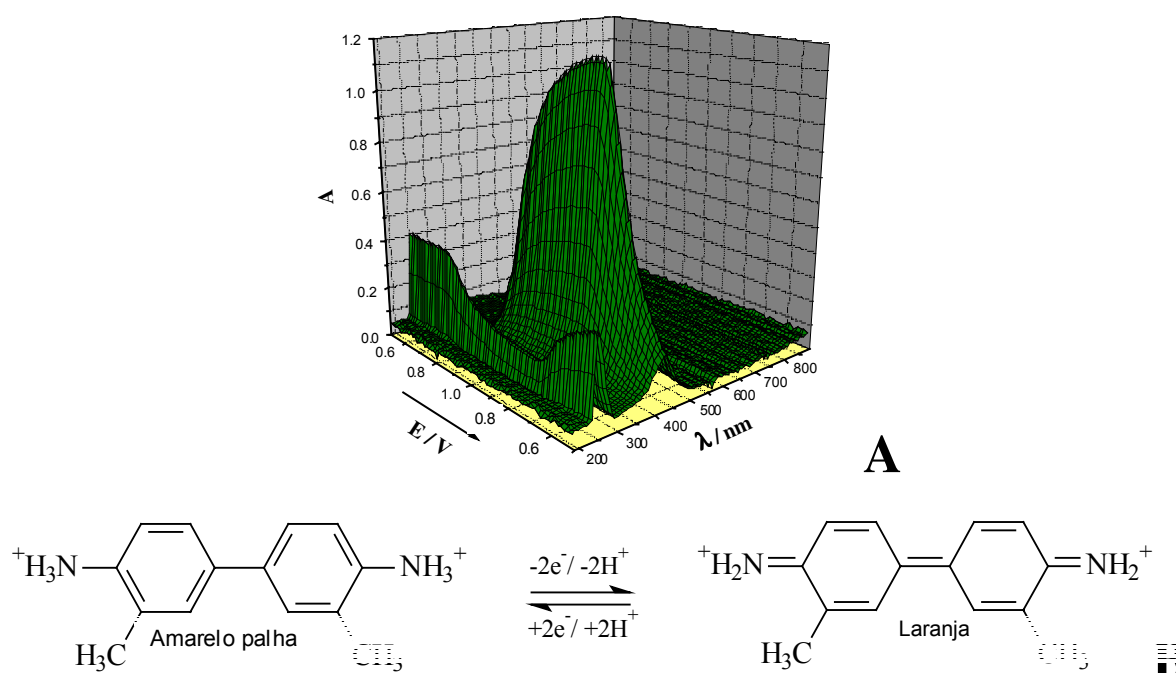


Figura 4.2 - Estudo espectroeletroquímico da *o*-tolidina no sistema SEC desenvolvido. a) Espectro tridimensional da *o*-tolidina com velocidade de varredura na voltametria cíclica de 1 mV s^{-1} ; b) Reação redox da *o*-tolidina.

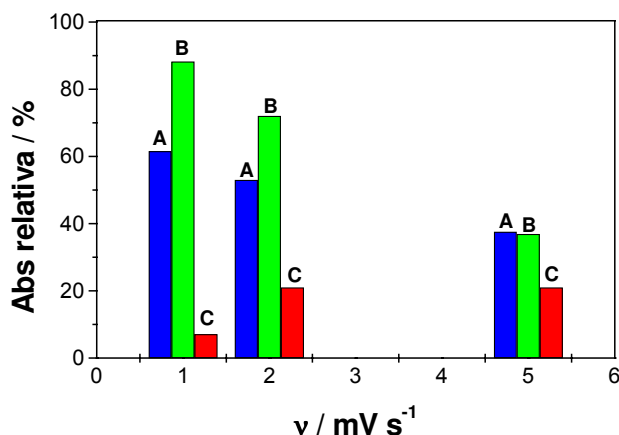


Figura 4.3 - Avaliação da influência da velocidade de varredura sobre o comportamento SEC da *o*-tolidina durante uma varredura realizada por voltametria cíclica, E_i : 0,50 V, E_{inv} : 1,0 V, E_f : 0,50 V, *o*-tolidina: $5,14 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em CH_3COOH ($0,125 \text{ mol L}^{-1}$) e HClO_4 ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$).

A porcentagem de diminuição da absorbância da banda referente a *o*-tolidina (258 nm) durante seu processo de oxidação, relativo ao máximo de absorbância apresentado inicialmente em 258 nm;

B porcentagem de recuperação da banda *o*-tolidina (258 nm) após o término do processo catódico, relativo ao máximo de absorbância inicialmente apresentado em 258 nm;

C porcentagem de resíduo da banda referente ao produto de oxidação da *o*-tolidina (432 nm) após o término do processo catódico, relativo ao máximo de absorbância apresentado em 432 nm.

A **Figura 4.2** mostra a variação da concentração de reagentes e produtos (**Figura 4.2b**), representada pelos valores de absorbância, durante a voltametria cíclica a uma taxa de 1 mV s^{-1} .

Considerando o potencial inicial (E_i) de +0,5 V na **Figura 4.2a**, observa-se apenas uma banda de absorção localizada em 258 nm devido a presença apenas de *o*-tolidina na cela (reagente). Conforme se inicia o processo de varredura anódica, observa-se uma diminuição no valor de absorbância da banda em 258 nm que tem início em aproximadamente +0,8 V e o aparecimento de uma segunda

banda localizada em 432 nm. Esta última banda surge devido a oxidação da *o*-tolidina na superfície do eletrodo de trabalho (minigrade de platina), conforme é possível observar na reação (**Figura 4.2b**). Durante a varredura de potencial anódico até o ponto de inversão ($E = +1,0$ V) e deste até $+0,8$ V (varredura catódica), observa-se um aumento da banda de absorção em 432 nm e uma diminuição da banda em 258 nm indicando que a reação de oxidação de *o*-tolidina ocorre durante todo esse período.

Após a passagem do potencial por $+0,8$ V, durante a varredura catódica, observa-se uma rápida diminuição do valor de absorbância da banda em 432 nm e um aumento do valor de absorbância da banda em 258 nm, indicando que a reação de redução da *o*-tolidina começa a ocorrer na superfície do eletrodo consumindo o produto inicialmente formado.

Finalmente, é possível observar que durante o ciclo de potencial não há regeneração de toda *o*-tolidina uma vez que a banda em 432 nm não retorna ao seu valor inicial de absorção, indicando que parte do produto formado na etapa de oxidação permanece em solução. Outro fator que reforça esta observação é o valor de absorção da banda em 258 nm que não retorna ao valor original mostrando que a *o*-tolidina não foi totalmente regenerada durante o ciclo de potencial aplicado na célula. Esta observação está relacionada ao tempo de varredura e de potencial e com a difusão dos reagentes e produtos em direção do eletrodo de trabalho ou se afastando deste.

Para avaliar a influência da velocidade de varredura sobre a reação da *o*-tolidina, foram realizadas medidas semelhantes às aquelas mostradas na **Figura 4.2** e cujos resultados são mostrados na **Figura 4.3**.

Três diferentes velocidades de varreduras foram avaliadas neste estudo, 1, 2 e 5 mV s^{-1} e em cada caso foi verificado o comportamento dos valores de absorção relativo as bandas de 258 e 432 nm.

A coluna **A** da **Figura 4.3** indica em termos percentuais a redução do valor de absorbância na banda de 258 nm no potencial de $+0,8$ V da varredura catódica. Observa-se que para varredura de 1 mV s^{-1} ocorreu uma redução de 60% do valor inicial de absorbância ($E_i = +0,5$ V), enquanto que apenas 33% de redução é

observado no experimento onde a velocidade de varredura foi de 5 mV s^{-1} . Ou seja, para uma velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} , 60% da *o*-tolidina é convertida no seu produto de oxidação, enquanto apenas 33% é convertida para varreduras de 5 mV s^{-1} .

A coluna **B** da **Figura 4.3** indica quanto da *o*-tolidina é recuperada após o final da varredura cíclica (um único ciclo). Este valor foi encontrado a partir da razão entre o valor de absorbância obtido no potencial final de varredura (E_f) e o valor inicial de absorbância em E_i . Observa-se que para valores de velocidades de varredura superiores a 1 mV s^{-1} a regeneração é inferior a 75%. Melhores valores de regeneração, de aproximadamente 90%, são obtidos para uma velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} . Estes resultados são normalmente encontrados para células de SEC perpendicular, conforme discutido por Daniel e colaboradores (2004).

Finalmente a coluna **C** da **Figura 4.3** indica o percentual do produto de oxidação da *o*-tolidina após término do ciclo de varredura. Este valor foi encontrado a partir da razão entre o valor de absorbância máxima obtido para a banda em 432 nm ($E = 0,8 \text{ V}$ na varredura catódica) e o valor final de absorbância em E_f . Verifica-se que a melhor regeneração ocorreu na taxa de varredura de 1 mV s^{-1} , não sendo observada diferença significativa para as demais taxas avaliadas.

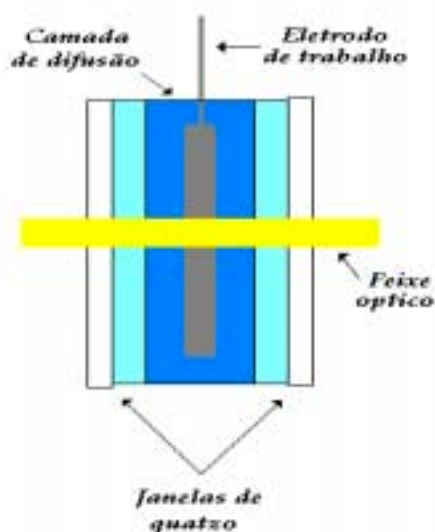


Figura 4.4. Esquema do caminho óptico na cela SEC (desenho ilustrativo).

Verificando o comportamento do produto de oxidação da *o*-tolidina na **Figura 4.3**, avaliado pela banda em 432 nm, considerando como valor de referência de absorvância para o cálculo da absorvância relativa o valor máximo obtido pelo produto da oxidação da *o*-tolidina em 432 nm, constatamos que a regeneração deste produto para *o*-tolidina foi de 88,2%, valor muito próximo daquele obtido quando este foi calculado através da recuperação da banda da *o*-tolidina em 253 nm. Este resultado indica que o produto que resulta na absorvância aproximada de 12% foi o que difundiu para fora da camada de difusão, impossibilitando uma regeneração completa da *o*-tolidina. Para melhor entender como se processa a formação da camada de difusão na cela, foi montado o esquema da **Figura 4.4**. Os resultados apresentados pela cela a baixas taxas de velocidade de varredura são satisfatórios para os objetivos propostos.

2. Interação de neurotransmissores com compostos carboxílicos

Muitos trabalhos envolvendo estudos sobre aminas biogênicas na presença de carboxilatos, em particular métodos de determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido relatados na literatura. No entanto, não se encontra praticamente discussão sobre os efeitos e as interações que esses compostos exercem sobre as mesmas. Recentemente, foi verificado em nosso grupo de pesquisa que o EDTA, adicionado ao eletrólito suporte, inibe a passivação do eletrodo de platina durante a oxidação de compostos fenólicos, sendo que a DA sofre oxidação em potenciais menores na presença do agente complexante do que na ausência deste [Carvalho, *et al.*, 2003]. Estes resultados indicaram a necessidade de estudos adicionais para esclarecer de que forma esses carboxilatos interagem com algumas aminas biogênicas, podendo inclusive influenciar e/ou modificar suas funções biológicas.

2.1. Comportamento eletroquímico de aminas biogênicas na ausência e presença de carboxilatos utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio

Em estudos anteriores foi verificado que o produto de oxidação da DA gerado na superfície do eletrodo de mercúrio interage com carboxilatos (citrato e EDTA) formando uma nova espécie eletroativa. Por outro lado, carboxilatos como NTA, EGTA, DTPA e oxalato não apresentaram interação com a DA previamente oxidada no HMDE [Winter, 2003]. Esses resultados evidenciaram que a estrutura do carboxilato tem influência no processo. Também foram realizados estudos, usando o HMDE, para avaliar qual a influência das estruturas das aminas biogênicas no processo de interação com carboxilatos. Foram avaliadas a DA, L-dopa e ST, onde foi verificado que, enquanto a DA e a L-dopa apresentam comportamento eletroquímico semelhante no HMDE, a ST não sofreu alterações com a adição do carboxilato ao eletrólito suporte [Winter, 2003].

A fim de complementar os resultados obtidos, estudos foram realizados utilizando epinefrina (EP) e norepinefrina (NEP).

2.1.1. Norepinefrina na presença e ausência de citrato

Em um primeiro estudo foi avaliado o comportamento eletroquímico da NEP na presença e ausência de citrato. Para tanto, foi usada a voltametria cíclica e o processo foi avaliado no eletrodo de mercúrio. Igualmente aos estudos já apresentados, promoveu-se anterior à varredura a oxidação da NEP. Os voltamogramas estão apresentados na **Figura 4.5**. É possível verificar que com a presença de citrato durante a oxidação da NEP, um produto eletroativo é formado entre o produto de oxidação da amina e o citrato em potenciais mais negativos, apresentando comportamento similar ao da DA e da L-dopa.

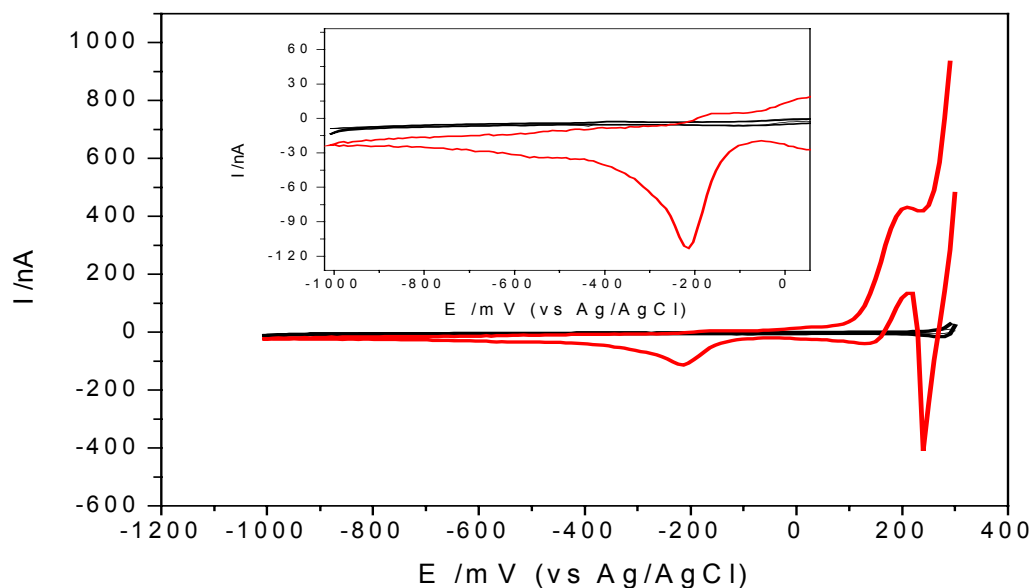


Figura 4.5 – Voltamograma cíclico para a norepinefrina em eletrodo de gota pendente de mercúrio na ausência e presença de citrato. (—) Norepinefrina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (—) Norepinefrina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, E_i : +300 mV, E_{inv} : -1000 mV, E_f : +300 mV, velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} , pH 7,5.

2.1.2. Epinefrina na presença e ausência de citrato

O mesmo estudo realizado para a NEP foi realizado para a EP, usando a voltametria cíclica. Como eletrólito suporte foi empregado KNO_3 , pH 7,5. Foi verificado que o citrato não altera o comportamento eletroquímico da EP, sendo que apenas um par redox em ambas situações foi observado nos voltamogramas (**Figura 4.6**) e a presença de citrato não levou a formação de um novo composto eletroativo, como observado anteriormente para a NEP.

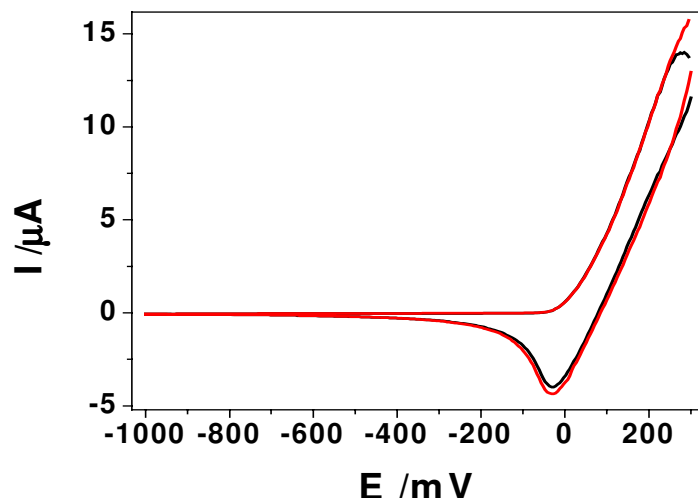


Figura 4.6 – Voltamograma cíclico para a epinefrina em eletrodo de gota pendente de mercúrio na ausência e presença de citrato. (—) Epinefrina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (—) Epinefrina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, E_i : +300 mV, E_{inv} : -1000 mV, E_f : +300 mV, velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} , pH 7,5.

A diferença no comportamento eletroquímico da NEP e EP sugere que o átomo de hidrogênio ligado à amina tenha um papel importante para a formação da nova espécie eletroativa, formada entre o produto de oxidação e citrato.

Através dos resultados eletroquímicos obtidos para os diferentes neurotransmissores na presença de citrato conclui-se que:

- (i) O produto de oxidação eletroquímica da amina biogênica somente é eletroativo na presença de citrato quando este estiver totalmente desprotonado, ou seja, na forma Cit^{3-} .
- (ii) A formação do novo produto eletroativo depende da estrutura da amina biogênica. Para que haja formação do produto é necessário que a amina biogênica apresente um grupo catecol e uma amina primária no grupo etilenodiamina, visto que esta interação ocorre por meio de ligações de hidrogênio nos três sítios possíveis de seus produtos de oxidação, como apresentado na **Figura 4.7**, justificando o motivo pelo qual somente a DA, a L-

dopa e a NEP produziram uma nova substância eletroativa em potenciais mais negativos.

Os produtos de oxidação da EP e da ST não apresentam indícios de interação com o citrato quando estudados por HMDE. Se alguma interação ocorre, os produtos dessas interações não são estáveis na escala de tempo avaliada e/ou eletroativos na faixa de potencial .

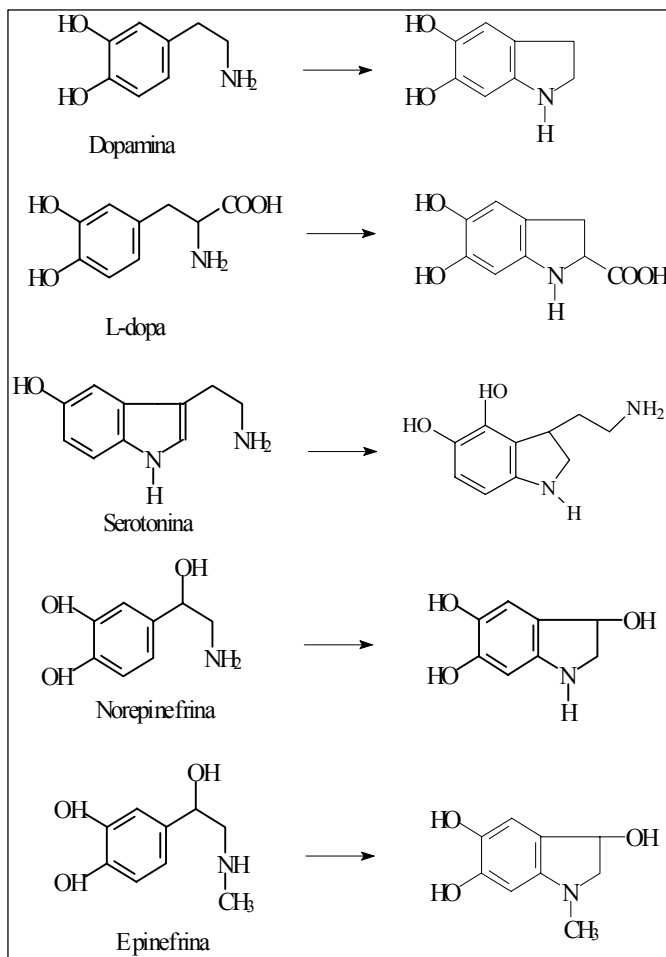


Figura 4.7 – Neurotransmissores avaliados e seus prováveis produtos de oxidação [Hawley, *et al.*, 1967; Jackson, *et al.*, 1995].

Através dessa avaliação foi possível propor uma possível estrutura de interação do citrato com os neurotransmissores: DA, L-dopa e NEP, previamente

oxidados na superfície do eletrodo, utilizando-se como modelo a DA (**Figura 4.8**) e corroborando com os estudos anteriormente realizados [Winter, 2003].

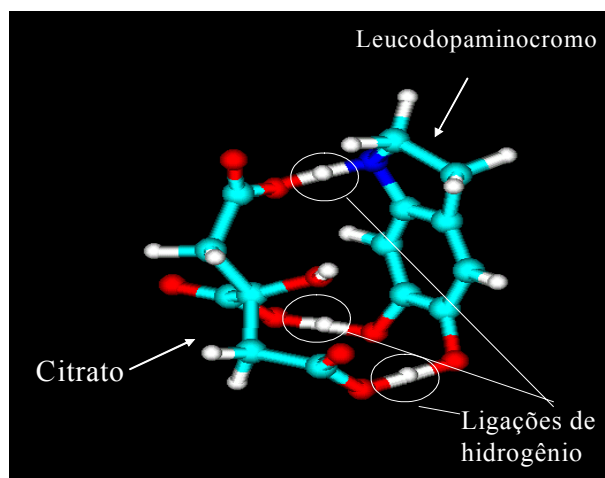
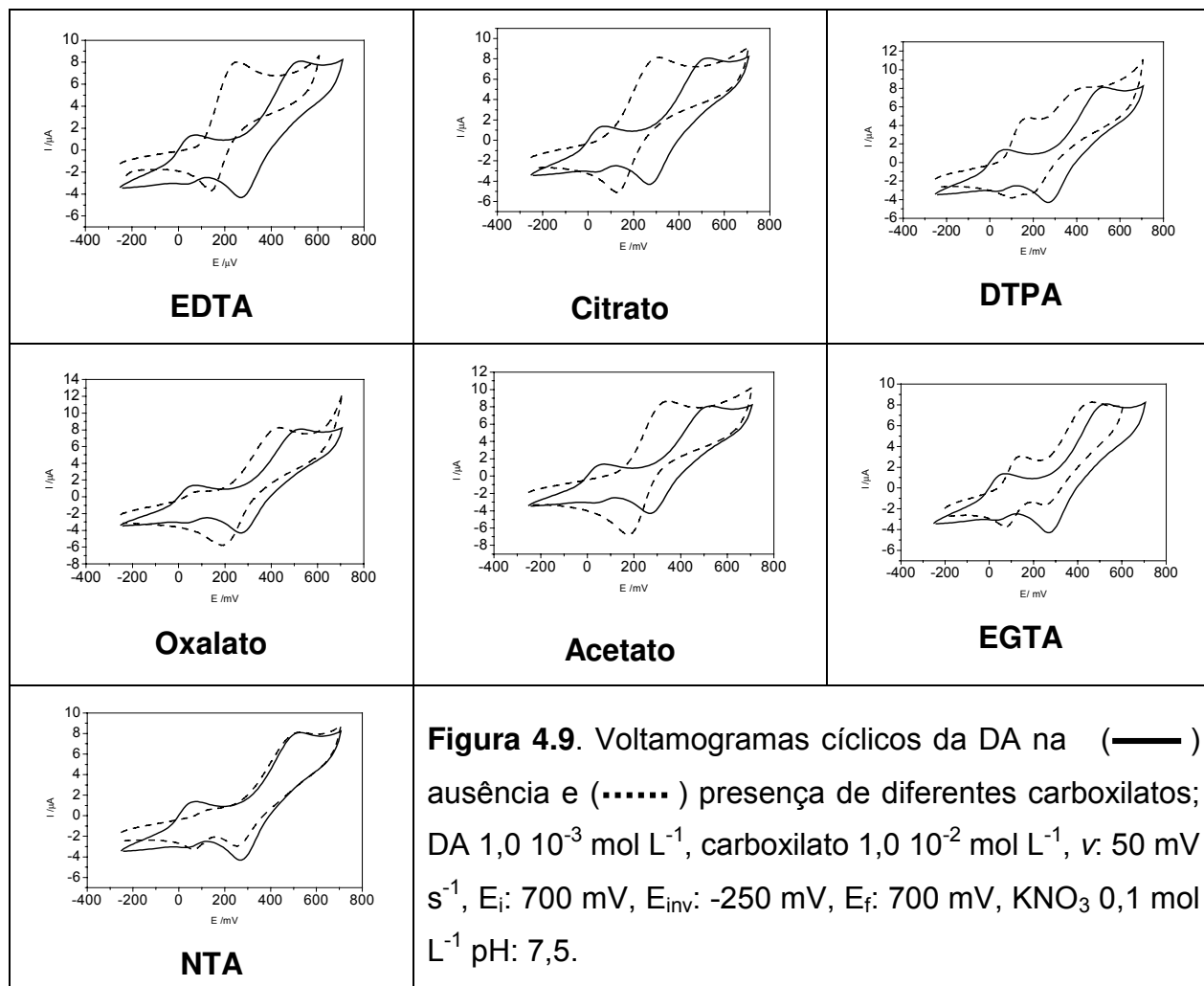


Figura 4.8 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o citrato. (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) nitrogênio.

2.2. Avaliação dos carboxilatos no processo de oxidação da dopamina empregando eletrodo de platina

Com a intenção de avaliar se os carboxilatos alteram também o comportamento redox da DA no eletrodo de platina, os carboxilatos: EDTA, citrato, DTPA, oxalato, EGTA, acetato e NTA, cujas estruturas dos ácidos estão apresentadas na parte experimental (**Figura 3.2, pág. 28**), foram adicionados ao eletrólito suporte e os voltamogramas obtidos foram comparados ao voltamograma da DA na ausência do carboxilato. É possível verificar que a DA na ausência de carboxilatos apresenta nos voltamogramas dois pares redox bem definidos (com potencial formal $E^{0'}$ em 53 e 398 mV). Com a adição dos carboxilatos, esses pares são deslocados, no sentido de formar um único par redox, o que pode indicar que os carboxilatos facilitam o processo redox da DA, favorecendo para que o processo ocorra em uma única etapa (**Figura 4.9**). Pelas informações até então obtidas, esta variação de comportamento se deve provavelmente as diferentes

estruturas dos carboxilatos, ao número de carboxilas presentes na estrutura e o número de carboxilas desprotonadas.



2.2.1. Influência dos compostos carboxílicos na degradação da DA

Dados da literatura apontam que o produto final da reação de oxidação da DA é um composto polimérico, derivado da melanina [Linert & Jameson, 2000]. Na determinação deste composto por voltametria com o auxílio de eletrodos sólidos, como platina, ocorre a passivação da superfície do eletrodo de trabalho, o que é atribuído a eletropolimerização da DA, onde a melanina ou composto semelhante adsorve na superfície do eletrodo. Em estudos prévios realizados em nosso grupo,

foi verificado que o EDTA inibe a passivação do eletrodo sólido durante a oxidação da DA [Carvalho, *et al.*, 2003]. Nesses estudos apenas foi verificado que o EDTA altera o processo de degradação da DA, no entanto, não foi esclarecido se existe uma correlação entre a estrutura do carboxilato e o número de carboxilas presentes na molécula e como essa reação de polimerização é inibida.

Para avaliar se existe uma correlação entre a estrutura dos carboxilatos e o efeito de passivação na oxidação da DA, diferentes carboxilatos foram selecionados para este estudo e voltamogramas cíclicos sucessivamente registrados, usando o eletrodo de platina. A avaliação deste fenômeno, que está ligada a oxidação da DA, foi realizada observando a variação da corrente do pico anódico da DA. Para facilitar a comparação entre os diferentes compostos carboxílicos, as correntes foram normalizadas e avaliadas em porcentagem, utilizando com base de cálculo a corrente de pico do primeiro voltamograma (Figura 4.10).

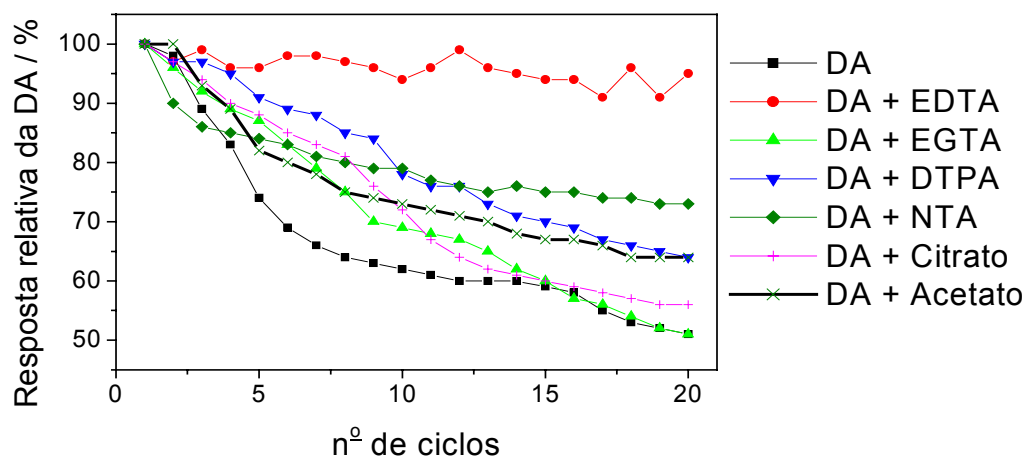


Figura 4.10 - Variação da I_{pa} na ausência e presença de diferentes compostos carboxílicos. Carboxilato $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; DA $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, v : 50 mV s^{-1} , E_i : 700 mV, E_{inv} : -250 mV, E_f : 700 mV, KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH: 7,5.

É possível observar na **Figura 4.10** que o EDTA inibe de forma mais eficiente a passivação do eletrodo uma vez que apresenta a menor perda na resposta da corrente anódica em função dos ciclos sucessivos. No entanto, é

possível verificar que outros carboxilatos, como o NTA e o DTPA também apresentam esta característica, embora não tão expressiva quanto o EDTA, que nos leva a sugerir que as estruturas, juntamente com o número de grupos carboxílicos por molécula, tanto protonadas como desprotonadas (avaliado através dos pK_a de cada composto carboxílico e a faixa de pH aplicada no estudo), influenciam o processo de passivação da superfície do eletrodo. Esses resultados indicam a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a relação estrutura molecular – fenômeno de passivação.

2.2.2. Estudo comparativo entre os carboxilatos avaliados

Após avaliar o comportamento de cada composto carboxílico sobre a reação redox da DA na superfície do eletrodo de platina, se torna interessante realizar uma avaliação comparativa dos resultados obtidos. Os parâmetros avaliados para comparar os 7 carboxilatos estudados foram: potências de picos anódicos e catódicos (para sistema que apresentam dois picos anódicos e/ou dois picos catódicos foi calculada a diferença de potencial entre eles, visto que esses picos se aproximam de diferentes formas dependendo do carboxilato), pH de estabilização do E^0 durante a faixa de pH onde este parâmetro foi avaliado (faixa de pH: 4,0 a 8,0) e a porcentagem de diminuição da corrente de pico anódica durante 20 ciclos consecutivos (indícios da polimerização do produto de oxidação da DA, apresentando como consequência a passivação da superfície do eletrodo). Os mesmos dados também foram comparados com a DA na ausência de compostos carboxílicos, denominada neste estudo como DA livre. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.2**.

Os gráficos de distribuição das espécies da DA e dos compostos carboxílicos, de acordo com os pK_a de cada composto, estão apresentadas na **Figura 4.11**.

Tabela 4.2 – Parâmetros obtidos no processo eletroquímico da DA na presença de diferentes carboxilatos no eletrodo de platina.

	Carboxilato	pK_a^b	E _{pa1} (mV)	E _{pa2} (mV)	ΔE _{pa} (mV)	E _{pc1} (mV)	E _{pc2} (mV)	ΔE _{pc} (mV)	pH estab.	Red. I _{pa} ^a
Carboxilatos com N (aminocarboxílicos)	DA sem carboxilatos	9,04	73	527	454	34	270	236	*	49
		10,58								
		12,07								
	EGTA	2,00	143	467	324	73	252	179	6,8	51
		2,65								
		8,85								
		9,46								
	NTA	3,03	142	522	380	64	254	190	*	27
		3,07								
		10,70								
	DTPA	1,79	179	431	252	99	174	75	**	36
		2,56								
		4,42								
		8,76								
		10,42								
	EDTA	1,99	-	254	-	-	137	-	7,0	5
		2,67								
		6,16								
		10,23								
Carboxilatos sem N	Ác. cítrico	3,13	-	310	-	-	126	-	7,3	45
		4,76								
		6,40								
	Ác. acético	4,74	-	344	-	-	174	-	6,8	36
	Ác. oxálico	1,27	103	435	332	-	191	-	-	-
		4,28								

Red I_{pa}^a: Porcentagem de diminuição da corrente de pico anódica durante 20 ciclos consecutivos; pH estab.: valor de pH onde os potenciais de pico permaneceram estáveis; (*) não houve alteração do E⁰ em função do pH. (**) Não ocorreu estabilização do E⁰ na faixa de pH avaliado (4,0 a 8,0). (-) Não apresentou valores para serem avaliados ou experimentos não realizados. E_{pa}: potencial de pico anódico; E_{pc}: potencial de pico catódico; ΔE_{pa}: diferença do potencial entre os picos anódicos; ΔE_{pc}: diferença do potencial entre os picos catódicos. (b [Merck Index])

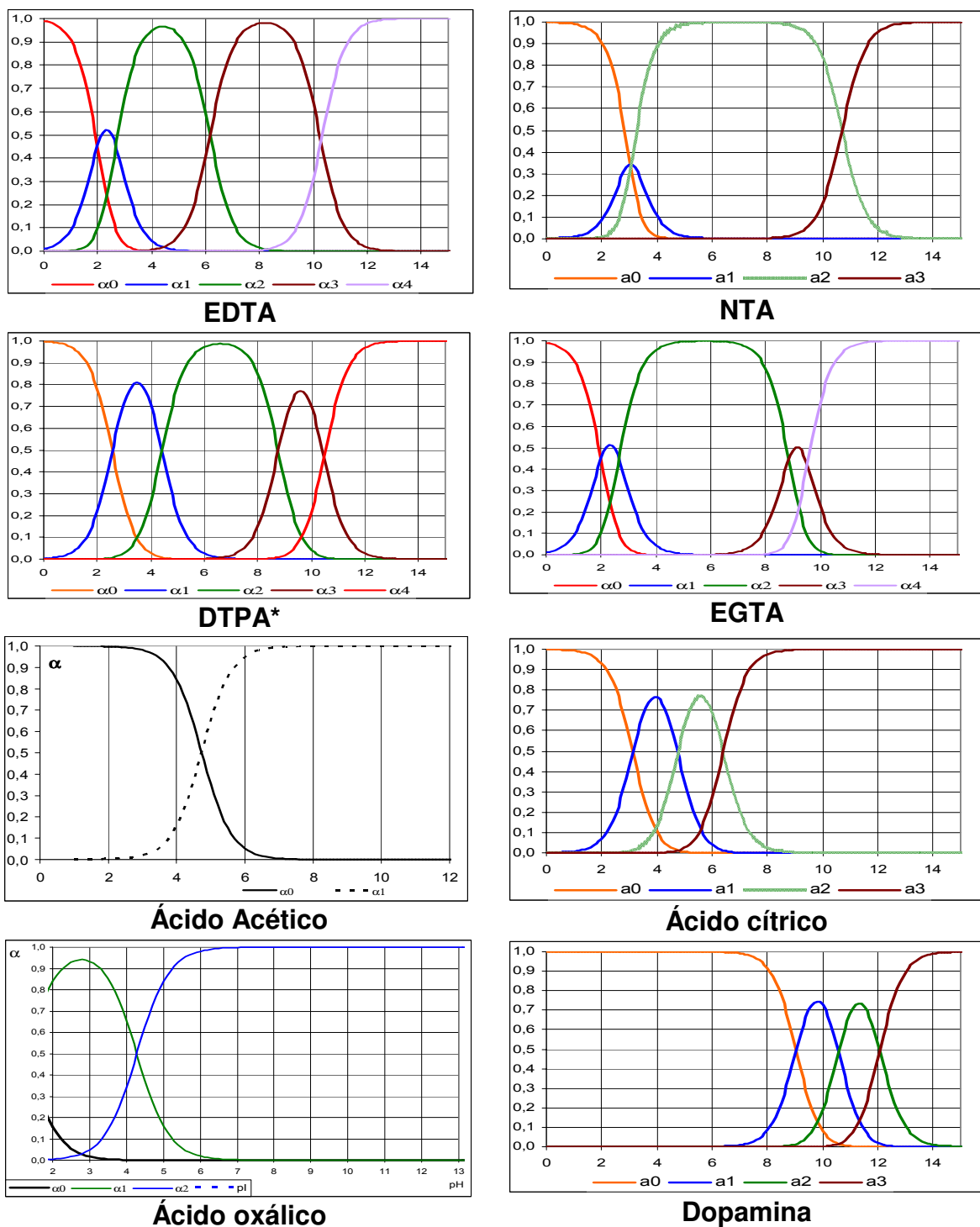


Figura 4.11 – Distribuição de espécies baseado nos valores das constantes de dissociação (pK_a). * O gráfico referente ao DTPA corresponde somente aos quatro últimos valores de pK_a . (<http://www.unc.br/~ferga/utills/>)

Quando avaliamos o comportamento do deslocamento do E^0 (potencial formal) referente ao segundo par redox da DA, na presença e ausência dos carboxilatos (superfície de resposta, **Figura 4.12**), é possível verificar que a tendência para que ocorra um deslocamento do E^0 para valores mais negativos está relacionado com o número de grupos funcionais desprotonados por molécula e o número de grupos totais que podem sofrer desprotonação por molécula. Esse resultado nos leva a concluir que quanto maior for a razão entre o número de sítios desprotonados e o número de sítios totais que podem sofrer desprotonação, maior será o deslocamento do E^0 para potenciais mais negativos, favorecendo o processo redox da DA.

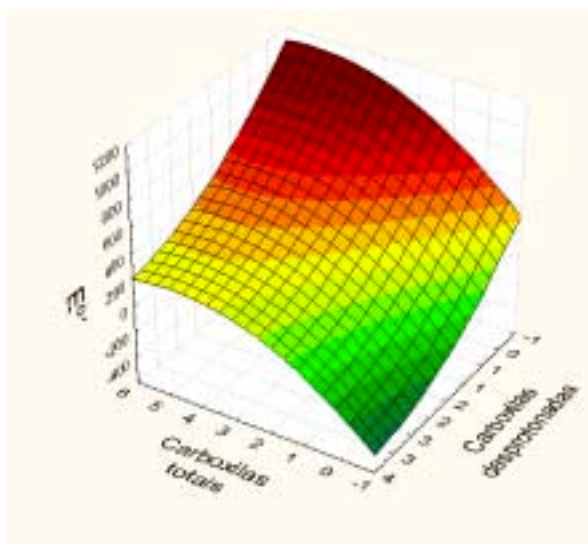


Figura 4.12 - Superfície de resposta: E^0 do segundo par redox da DA na presença de diferentes carboxilatos, correlacionando o número de grupos funcionais que podem sofrer desprotonação presente em cada composto carboxílico com o número de grupos funcionais desprotonados de cada composto baseado nas informações da tabela 4.2.

Os carboxilatos avaliados (**Tabela 4.2**) podem ser separados em dois grupos: carboxilatos com nitrogênio (compostos com propriedades quelantes) e carboxilatos sem nitrogênio. Para os carboxilatos com nitrogênio (**Figura 4.13**) é possível verificar que quanto maior o número de grupos funcionais desprotonados

por molécula, avaliadas em função do pH do meio, maior é o deslocamento do potencial de pico para valores mais próximos de zero, indicando que a presença do composto carboxílico durante o processo eletroquímico favorece o processo redox da DA. É possível verificar, também, que quanto maior é a proporção de grupos funcionais desprotonados em relação ao número total de grupos que podem sofrer desprotonação, maior é o deslocamento para potenciais mais negativos.

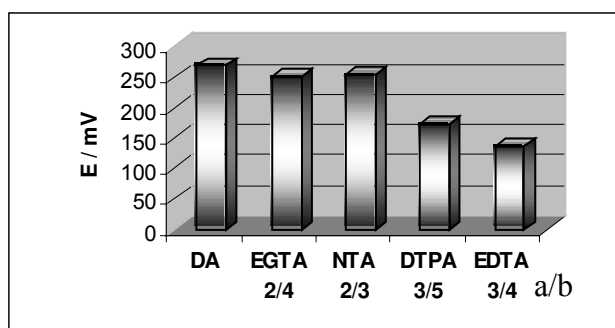


Figura 4.13 - Variação do potencial do E_{pc} da DA na ausência e presença de carboxilato em função do carboxilato avaliado e o número de carboxilas desprotonadas (nome do carboxilato a/b, onde “a” é o número de grupos funcionais desprotonados por molécula no pH avaliado e “b” é o número total de grupos funcionais que podem ser desprotonados na molécula. Exemplo: EGTA possui 2 sítios desprotonados em pH 7,5 para um total de 4 sítios que podem sofrer desprotonação por molécula.

Quando foram avaliados os compostos carboxílicos que não apresentam nitrogênio em sua estrutura, como é caso do ácido cítrico, ácido acético e ácido oxálico, foi verificado que existe uma correlação entre o número de grupos carboxílicos por molécula e o deslocamento do potencial de pico catódico da DA (correlação $(r) = 0,89$) (**Figura 4.14**). O mesmo comportamento é observado para o $E^{0'}$. A tendência é uma diminuição do potencial de pico em função do aumento do número de carboxilas desprotonadas na mesma molécula.

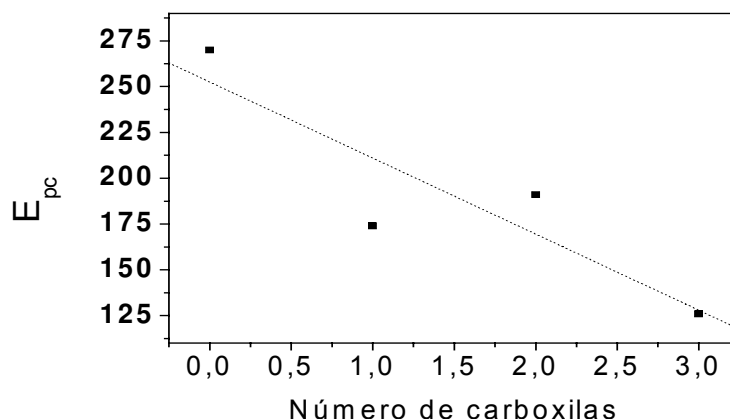


Figura 4.14 - Variação do E_{pc} da DA em função do número de carboxilas desprotonadas para compostos sem N.

É possível verificar que, quando separamos as moléculas dos compostos carboxílicos em dois grupos, a tendência é a mesma, mas o que difere é que para os compostos carboxílicos sem átomos de nitrogênio, em $pH > 7$, as carboxilas estão completamente desprotonadas, o que não ocorre com os compostos carboxílicos com átomos de nitrogênio, dado este que nos levou a realizar um tratamento diferenciado dos grupos dos compostos carboxílicos, pois até o momento não foi evidenciada uma alteração no comportamento dos grupos devido à presença de átomos de nitrogênio na molécula.

Portanto, a interação depende, além da estrutura da amina biogênica (avaliada com o eletrodo de mercúrio) de outros dois fatores: (a) o pH, o qual vai determinar o número de grupos funcionais desprotonados em cada composto carboxílico; (b) a estrutura de cada composto carboxílico, onde a posição de cada grupo carboxílico, o número de carboxilas e o comprimento das cadeias influenciam nas interações com as aminas biogênicas e/ou seus produtos de oxidação. Cabe destacar que o pKa da DA não foi considerado visto que a mesma se encontra totalmente protonada na faixa de pH avaliada.

2.2.3. Estudo da interação do EDTA com outras aminas biogênicas

Buscando comprovar os estudos realizados com o eletrodo de mercúrio, foi verificado se o EDTA também interage com outras aminas biogênicas, com um efeito semelhante ao apresentado para a DA. Para tanto, foram registrados voltamogramas sucessivos (10 ciclos), empregando o eletrodo de platina na presença e ausência de EDTA, avaliando assim a influência do EDTA no processo eletroquímico das aminas biogênicas: EP, ST, L-dopa e NEP. Um dos parâmetros utilizados para realizar esta avaliação foi baseado no fenômeno já descrito em trabalhos anteriores, onde o EDTA tem a capacidade de evitar o depósito de compostos poliméricos na superfície de eletrodos sólidos. Sendo assim, foi avaliada a variação da corrente anódica das aminas biogênicas entre os ciclos sucessivos, no sentido de evidenciar uma possível passivação da superfície do eletrodo. As concentrações de EDTA e das aminas biogênicas foram de $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. As respostas foram convertidas para percentagem de corrente relativa a corrente do primeiro ciclo.

É possível observar um comportamento semelhante para a DA, L-dopa e NEP (**Figura 4.15**), ou seja, não há variação significativa entre as correntes anódicas durante os 10 primeiros ciclos sucessivos, o que indica que o EDTA inibe o processo de passivação durante as varreduras de potencial. No entanto, para a EP e ST foi verificado que o EDTA apenas minimizou, mas não evitou o fenômeno de passivação do eletrodo.

Estes resultados vêm confirmar a hipótese apontada nos estudos anteriores para o eletrodo de mercúrio, onde foi proposto que para que ocorra a interação com os carboxilatos, as aminas biogênicas precisam apresentar em sua estrutura um grupo etilenoamino (amina primária) e um grupo catecol, o que não é o caso da EP e ST.

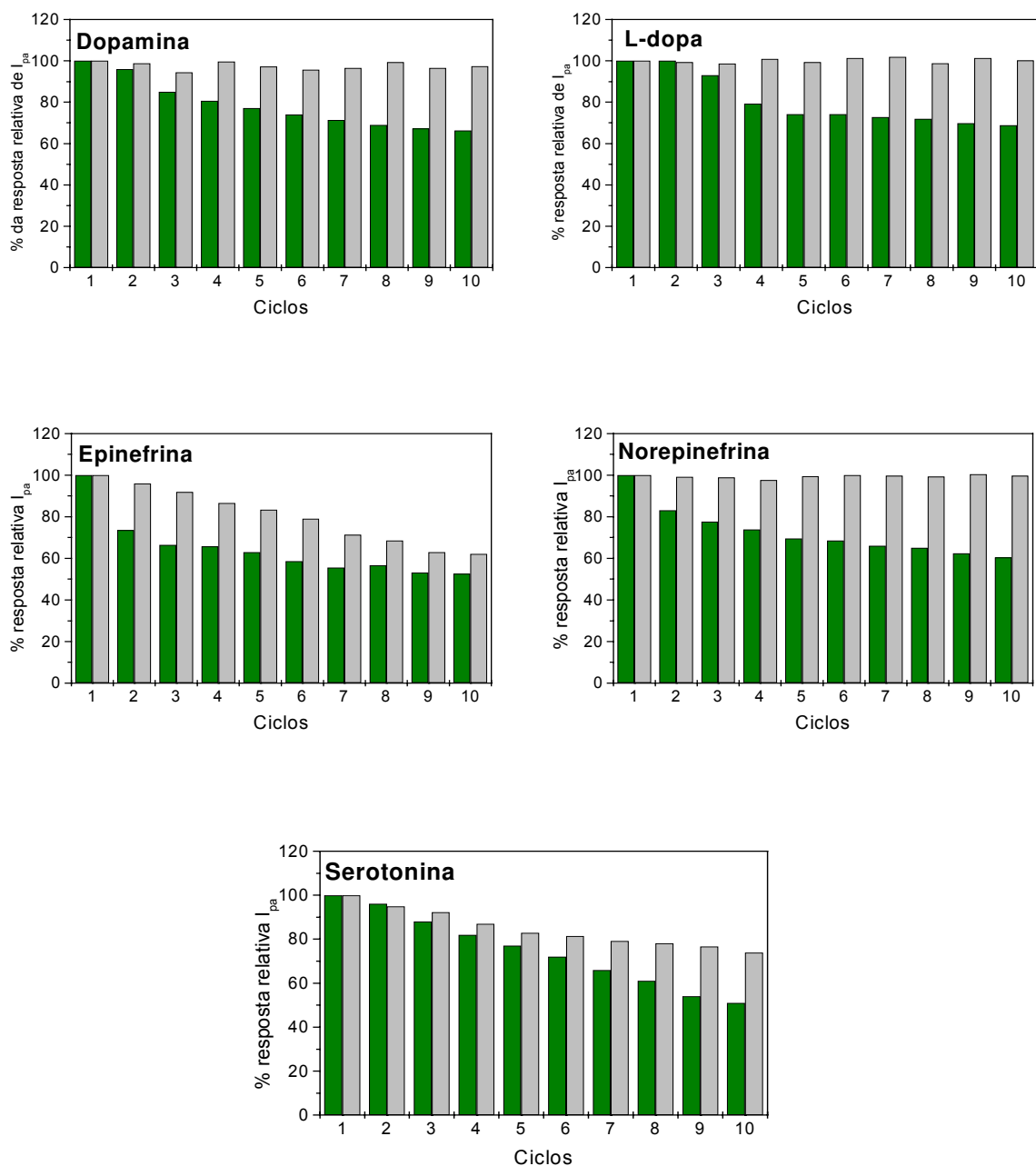




Figura 4.15 - Resposta relativa da corrente anódica entre varreduras cíclicas sucessivas, usando o eletrodo de platina para diferentes aminas biogênicas na () presença e () ausência de EDTA: dopamina; epinefrina; serotonina; norepinefrina; L-dopa; v: 50 mV s⁻¹, E_i: -100 mV, E_{inv}: 800 mV; E_f: -100 mV, KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ pH 7,5.

2.3. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na presença de carboxilatos

Inicialmente, como realizado nos estudos anteriores, foi avaliado o comportamento espectroeletroquímico da DA na cela SEC. Posteriormente, as demais aminas biogênicas foram avaliadas e os resultados obtidos comparados com aqueles obtidos para a DA.

2.3.1. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na ausência de carboxilatos

Primeiramente foi avaliado o comportamento espectroeletroquímico da DA em diferentes valores de pH no intervalo de 3 a 9, para que posteriormente pudesse ser avaliada a influência dos carboxilatos.

Foi verificado que o processo redox da DA independe do pH do meio (no intervalo de 3 a 9). Na **Figura 4.16** são apresentados os gráficos para a DA obtidos em pH 4 (**Figura 4.16 A**) e 7 (**Figura 4.16 B**), onde é possível verificar o mesmo perfil espectral para ambos valores de pH durante a varredura de potencial.

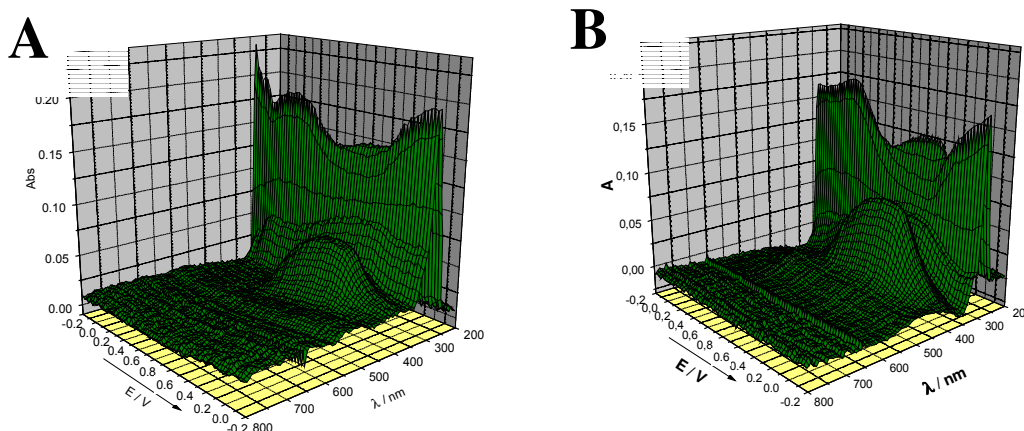


Figura 4.16 - Espectros da DA durante a varredura de potencial (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). **(A)** pH 4,0 **(B)** pH 7,0. DA $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, KNO₃ 1,0 mol L⁻¹, v : 2 mV s⁻¹.

Durante o processo redox verifica-se a presença de três novas bandas além da banda referente a DA (280 nm), com máximos de absorbância em 265, 314 e 380 nm (**Figura 4.17**). A **Figura 4.17A** mostra diferentes espectros (200 no total) obtidos durante uma varredura cíclica com E_i : -0,20 V, E_{inv} : +0,80 V e E_f : -0,20 V. A partir desta figura, em 3 dimensões, foram retirados apenas três espectros, mostrados na **Figura 4.17B**, sendo eles: o espectro obtido no potencial inicial, E_i (-0,20 V), onde nenhum processo eletrolítico foi realizado; o espectro obtido no potencial de inversão E_{inv} (+0,80 V), após oxidação da DA e o espectro obtido no potencial final E_f (-0,20 V), onde termina a varredura inversa e o potencial é o mesmo do potencial inicial (avaliação do processo de redução do produto previamente oxidado na varredura direta).

Durante o tratamento dos dados, além dos espectros tridimensionais, foram avaliados sempre os mesmos três espectros para realizar as comparações entre os estudos, mantendo as condições eletroquímicas constantes.

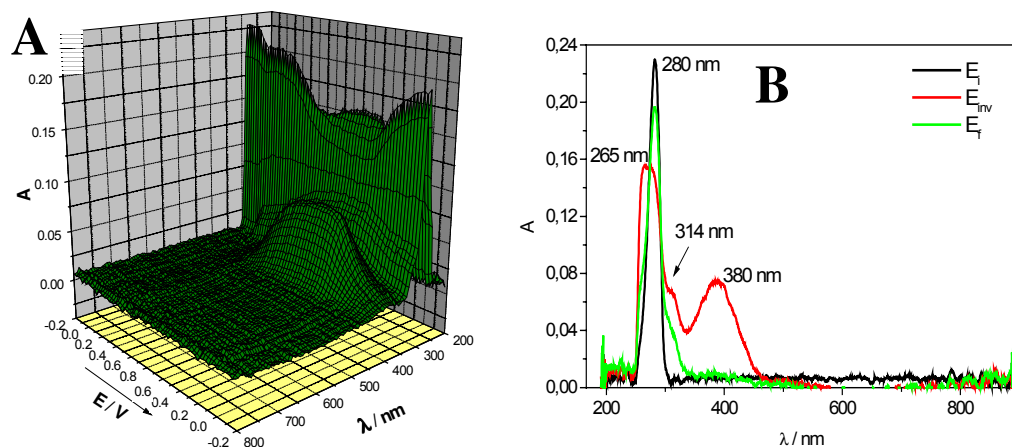


Figura 4.17 – (A) Espectros da DA durante a varredura de potencial. **(B)** Espectros da DA em função do potencial aplicado (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). DA $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L $^{-1}$, KNO $_3$ 1,0 mol L $^{-1}$, pH: 5,0, v : 2 mV s $^{-1}$.

Como já apresentado nos estudos do comportamento eletroquímico da DA, foi verificado nos voltamogramas a presença de dois pares redox com E^0 de 53 e

398 mV. Com a intenção de identificar quais os produtos que originam cada par redox respectivamente, foi realizado um estudo espectroeletroquímico. Para facilitar a avaliação de cada par redox separadamente, a técnica eletroquímica que melhor se aplica é a amperometria. Durante as medidas amperométricas é aplicado um potencial constante em função do tempo, permitindo assim acompanhar a formação de produtos intermediários.

Levando em consideração os potenciais dos picos anódicos (73 e 527 mV), foi selecionado um potencial intermediário de 200 mV, capaz de oxidar a DA para originar apenas o primeiro produto responsável pelo pico anódico em 73 mV. Para avaliar qual das bandas observadas na **Figura 4.17B** é responsável pela formação do primeiro pico anódico no voltamograma da DA, foi acompanhada a absorvância em função do tempo para as bandas presentes na **Figura 4.17B** (265, 280, 314 e 380 nm) como mostra a **Figura 4.18**.

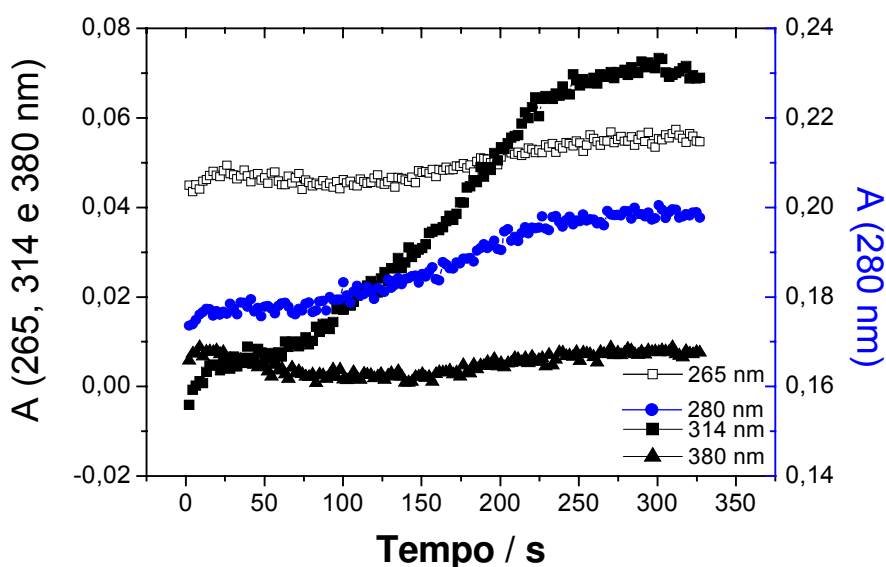


Figura 4.18 – Variação dos valores de absorvância das bandas durante o processo redox da DA livre com potencial fixo em função do tempo. E: 0,20 V. $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 7,0.

A partir dos resultados obtidos (**Figura 4.18**) observa-se que a banda em 314 nm apresenta a maior variação de absorvância durante as medidas

amperométricas. As bandas nos demais comprimentos de onda permanecem praticamente constantes em função do tempo em que é aplicado o potencial.

Procedimento semelhante foi utilizado para um potencial de 700 mV, no qual foi promovida a oxidação completa da DA. Novamente as mesmas bandas indicadas na **Figura 4.17** foram monitoradas, avaliando suas absorbâncias em função do tempo. Neste caso o valor de absorbância da banda em 280 nm diminuiu simultaneamente com o aumento das demais três bandas, referentes aos produtos de oxidação da DA (**Figura 4.19**). Estas apresentam diferentes valores de absorbância, mas o comportamento da absorbância em função do tempo é semelhante. Isto pode indicar duas hipóteses: (i) o produto de oxidação da DA apresenta diferentes grupos cromóforos com diferentes absorvidades molares, por isso esta diferença nos valores de absorbância para cada comprimento de onda; (ii) diferentes produtos de oxidação estão absorvendo na mesma faixa de comprimento de onda, onde dois ou mais produtos apresentam os mesmos grupos cromóforos.

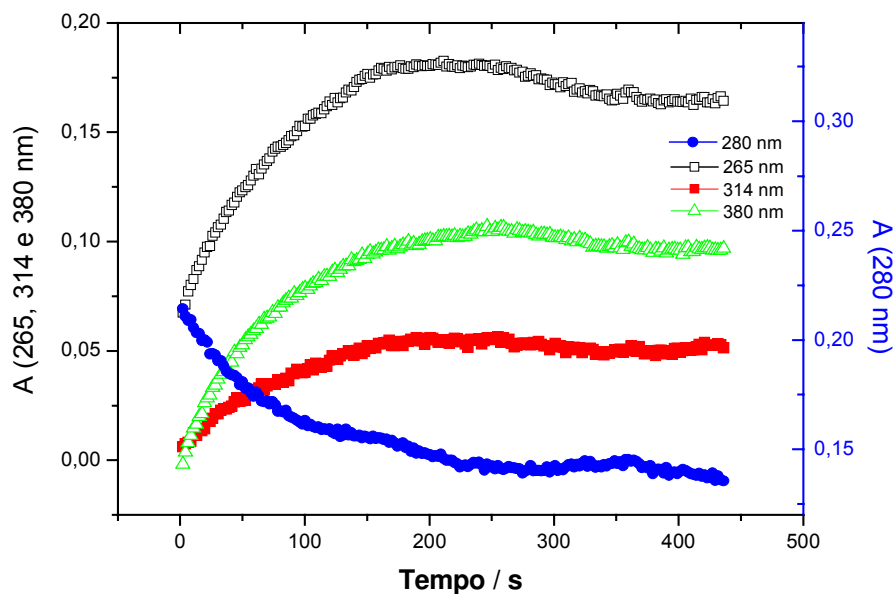


Figura 4.19 - Variação dos valores de absorbância das bandas durante o processo redox da DA livre em potencial fixo em função do tempo. E: 0,70 V. $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 7,0.

Após avaliar as principais bandas originárias no processo de oxidação da DA se fez necessário fazer uma correlação com as estruturas propostas no mecanismo eletroquímico para a reação de oxidação da DA (**Figura 4.20**).

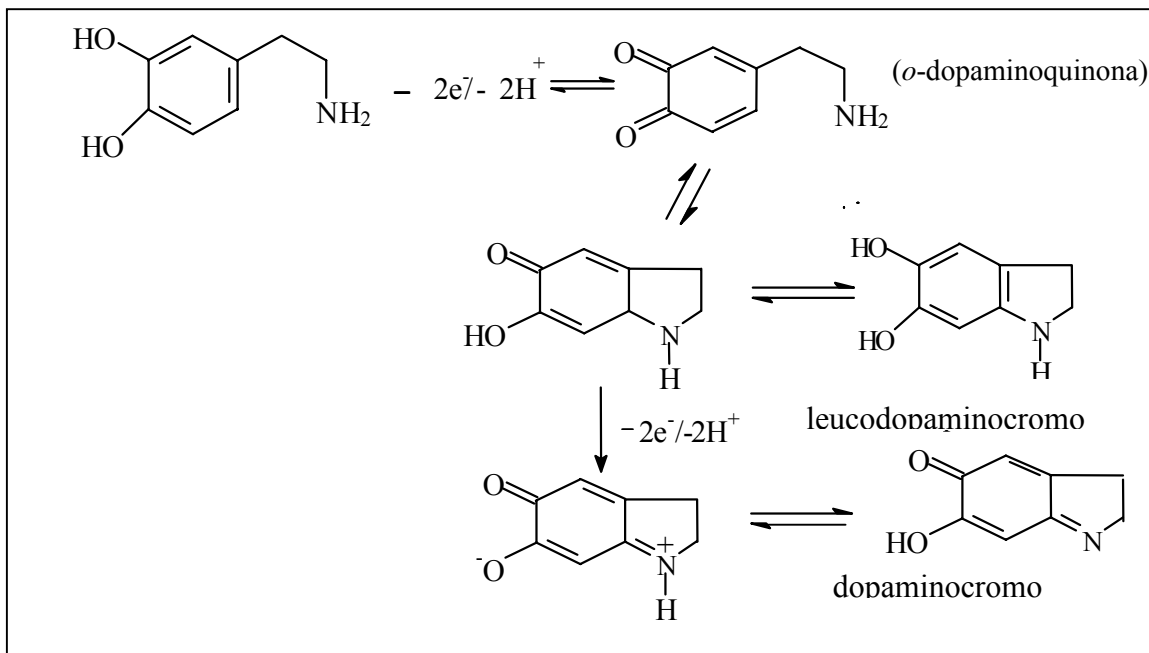


Figura 4.20 - Mecanismo de oxidação da DA [Hawley, *et al.*, 1967].

Os dados obtidos mediante os estudos da espectroeletroquímica são importantes do ponto de vista de trazer informações adicionais sobre os possíveis produtos que são formados durante a varredura de potencial dos compostos em estudo. No entanto, uma vez que não se têm esses produtos disponíveis comercialmente e esses não são passíveis de serem isolados em decorrência de serem instáveis, faz-se necessário comprovar que as bandas observadas na região do UV-Vis realmente indicam a formação dos produtos intermediários da reação sugeridos na **Figura 4.20**. Para tanto, foram simulados os espectros eletrônicos dos compostos de interesse, usando o programa HyperChem. Os resultados experimentais (comprimentos de onda de máxima absorbância) foram comparados com os valores obtidos experimentalmente pela técnica SEC. Considerando o solvente utilizado, os comprimentos de onda teóricos calculados

foram acrescidos de 8 nm, para fins de correção para o meio aquoso, visto que o cálculo é realizado para o estado gasoso [Silverstein, *et al.*, 1991].

Para facilitar a compreensão dos dados, cada banda foi avaliada separadamente, considerando inclusive as sobreposições. Como as bandas praticamente não sofrem alterações quanto ao comprimento de onda de máxima absorvância com a variação do pH durante a voltametria cíclica, somente o valor de pH 6,0 foi selecionado para os estudos (**Figura 4.21**).

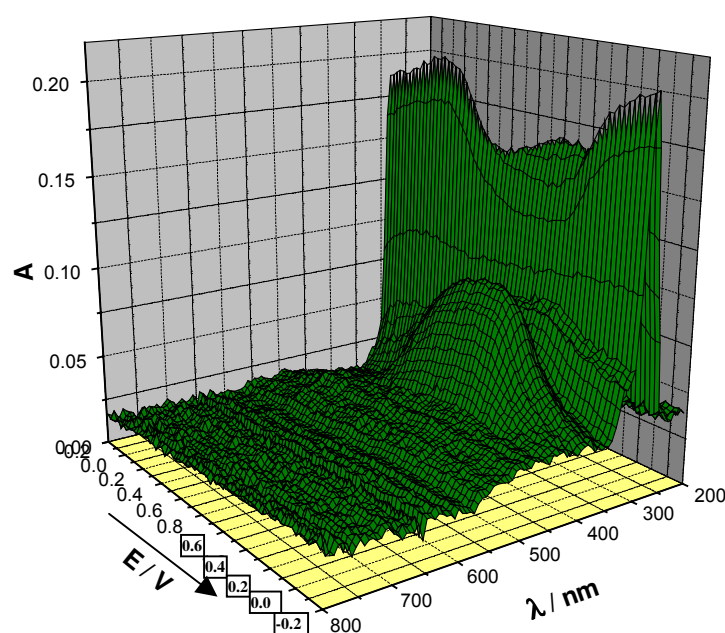


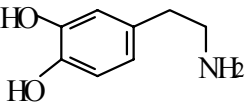
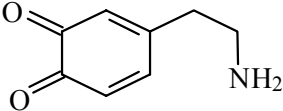
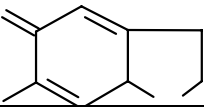
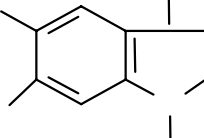
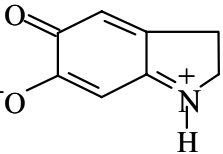
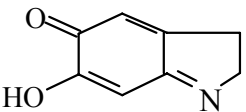
Figura 4.21 - Espectros da DA durante a varredura de potencial. DA $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, KNO₃ 1,0 mol L⁻¹, pH: 6,0, v : 2 mV s⁻¹.

Mediante o programa computacional duas bandas são previstas para a DA com máximos de absorvância em 232,0 e 279,4 nm. No espectro obtido experimentalmente pela técnica SEC verifica-se apenas um máximo de absorvância em 280 nm.

Na **Tabela 4.3** estão apresentados os possíveis compostos de oxidação da DA, inclusive para formas tautoméricas, com seus respectivos nomes e

comprimentos de onda de máxima absorvência teórica, calculadas mediante programa computacional HyperChem.

Tabela 4.3. Comprimentos de onda de máxima absorvência dos espectros eletrônicos teóricos para os produtos intermediários da reação de oxidação da DA.

Estrutura	Nome	λ (nm)
	Dopamina (DA)	232
		279
	<i>o</i> -Dopaminoquinona (DQ)	320
		379
		449
	Leucodopaminocromo (LDC 1)	308
		379
	Leucodopaminocromo (LDC 2)	245
		257
	Dopaminocromo (DC 1)	275
		310
		372
	Dopaminocromo (DC 2)	484
		263
		314
		377

Posterior a avaliação do espectro de cada composto intermediário do processo de oxidação da DA, os comprimentos de onda estimados foram comparados com os obtidos através da SEC. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.4.**

Tabela 4.4. Comparação entre os comprimentos de onda de máximo de absorção encontrados por meio do uso da espectroeletrólise com valores calculados teoricamente para a DA e seus compostos intermediários originados no processo de oxidação eletroquímica.

Composto	λ experimental (nm)	λ teórico (nm)
LDC 2	265	257
DC 2		263
DA	280	279
DQ	314	320
LDC 1		308
DC 1		310
DC 2		314
DQ	380	379
LDC 1		379
DC 2		377

Por meio da **Tabela 4.4** é possível verificar que existe uma relação entre os valores encontrados teoricamente e os valores obtidos experimentalmente, sendo possível indicar os principais produtos envolvidos neste mecanismo de reação.

Quando foram apresentados anteriormente os resultados referentes aos estudos amperométricos, no intuito de avaliar qual seria o composto responsável pelo primeiro par redox no processo eletroquímico da DA, foi verificado que a banda que sofre uma alteração significativa durante o processo com potencial aplicado de 0,20 V (vs Ag/AgCl) apresentou comprimento de onda em aproximadamente 314 nm. Quando avaliamos os possíveis compostos intermediários da DA, verificamos que 3 compostos apresentam uma banda de absorção muito próxima a este comprimento de onda experimental, DQ, LDC 1, DC 1 e DC 2. No entanto, quando avaliamos a sequência da reação (**Figura 4.20**), podemos verificar que provavelmente esta banda refere-se inicialmente a DQ, que posteriormente tem um aumento da absorbância devido à sobreposição dos

demais compostos formados em solução. É importante ressaltar que a DQ apresenta teoricamente outras bandas, as quais não podem ser observadas quando avaliamos a oxidação da DA em função do tempo aplicando-se um potencial de +0,2 V (**Figura 4.22**). Entende-se assim que estas bandas não apresentam uma alta absorvidade molar, se destacando somente a banda em 314 nm.

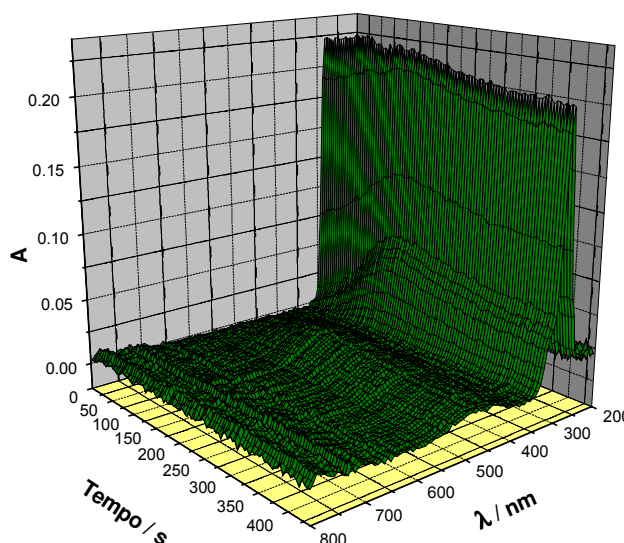


Figura 4.22 – Espectros da DA em função do tempo em potencial constante de 0,20 V. DA $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 6,0,

É importante ressaltar que as bandas apresentadas no espectro eletrônico teórico, calculadas para cada espécie, apresentam seus correspondentes experimentais, confirmando o mecanismo apresentado em literatura. Estes resultados nos mostram que a simulação dos espectros teóricos servirá como uma importante ferramenta no decorrer deste trabalho para estudar os mecanismos envolvidos no processo de interação entre as aminas biogênicas e/ou seus produtos de oxidação e os compostos carboxílicos.

2.3.2. Estudo espectroeletroquímico da dopamina na presença de carboxilatos

Para estudar a influência da estrutura do carboxilato no processo espectroeletroquímico da DA, foram avaliados os seguintes compostos: EDTA, DTPA, EGTA, NTA, acetato e citrato, no intervalo de pH de 3 a 9. Nesses estudos a concentração do carboxilato na cela foi 20 vezes maior que a concentração de DA (carboxilato $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e DA $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Anterior às medidas SEC da DA na presença de carboxilato foi registrado um branco (eletrólito suporte mais composto carboxílico) para verificar se estes compostos carboxílicos apresentam bandas nos espectros registrados durante a varredura de potencial. Este estudo foi realizado para todos os compostos carboxílicos avaliados. O branco obtido para o EDTA está apresentado na **Figura 4.23**.

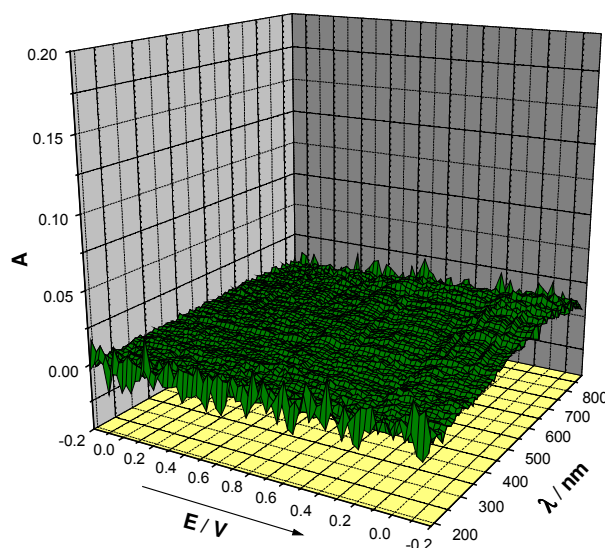


Figura 4.23 - Espectros do EDTA $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 7,5, durante a varredura de potencial E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1}

É possível observar na **Figura 4.23** que o EDTA não apresentou variações no espectro UV-Vis na janela de potencial estudada na voltametria cíclica. O

mesmo comportamento foi verificado para os demais compostos carboxílicos sob estudo.

Posteriormente, foram obtidos espectros em 3 dimensões da DA na presença de compostos carboxílicos.

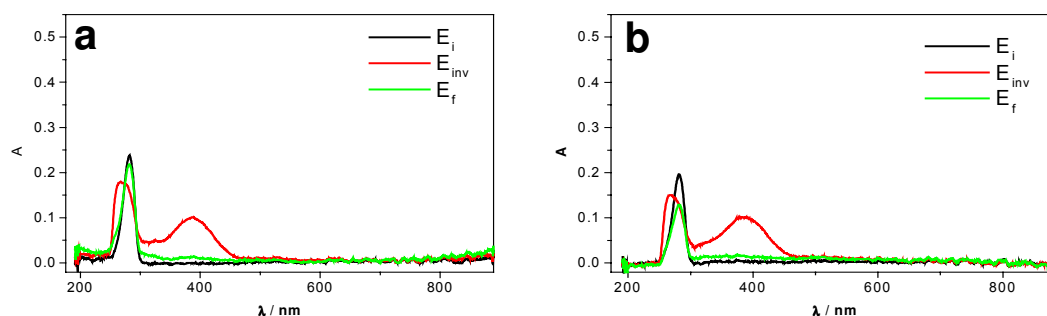
Primeiramente foram avaliados os efeitos do citrato e do EDTA e a influencia do pH do meio sobre o comportamento SEC da DA.

Para pH 4,0, tanto na presença de citrato como de EDTA, o comportamento da DA é o mesmo verificado na ausência de carboxilatos (**Figura 4.24.1**), onde se observa a presença de três bandas características, 265, 280 e 380 nm.

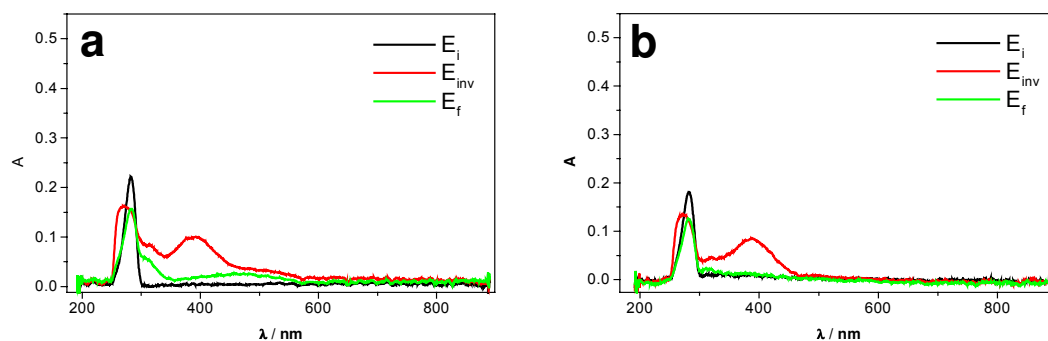
Quando é empregada a amperometria, o comportamento encontrado para a DA na presença de citrato ou EDTA é semelhante ao encontrado na ausência destes, indicando que no pH 4,0, considerando os dados experimentais, não ocorre interação entre os carboxilatos com a DA e/ou seus produtos de oxidação.

Em pH 5,0, observa-se que a presença de citrato causa o aparecimento de uma banda larga em 480 nm. Este mesmo comportamento não é observado para o EDTA (**Figura 4.24.2**).

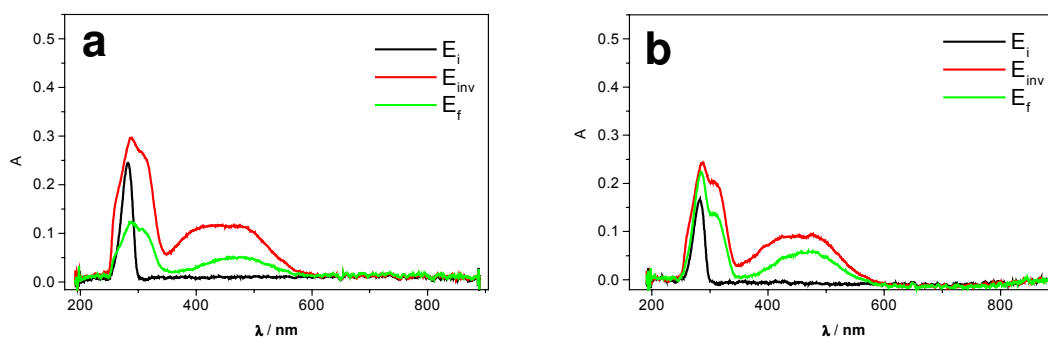
1



2



3



4

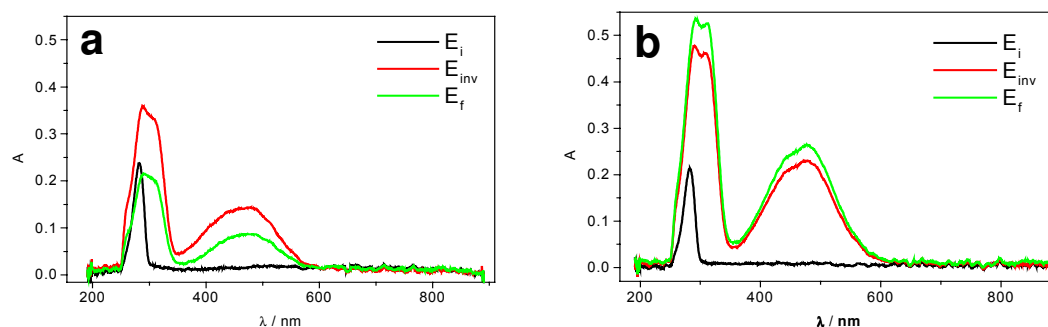


Figura 4.24 - Espectros da DA $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, na presença de a) citrato $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e b) EDTA $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. 1: pH 4,0; 2: pH 5,0; 3: pH 6,0 e 4: pH 7,0. E_i : -0,20 V; E_{inv} : 0,80 V; E_f : -0,20 V;

Com base em dados da literatura pode-se atribuir que a banda com máximo de absorvância em 480 nm é referente à formação de dopaminocromo (DC) [Linert & Jameson, 2000]. Esse comprimento de onda de máxima absorvância também foi estimado, através da simulação de espectros, para uma das formas tautoméricas do DC, o DC1 (**Tabela 4.3**). Como a banda em 480 nm não é observada para os espectros obtidos na varredura de potencial para a DA, sugere-se a formação e estabilização do DC pelo citrato. Esta interação já foi proposta em

trabalho anterior [Winter, 2003]. Na **Figura 4.25** são apresentadas as variações das absorbâncias em diferentes comprimentos de onda (máximos de absorbância das principais bandas observadas na **Figura 4.23.1a**) em função do tempo quando um potencial fixo de +0,70 V é aplicado no eletrodo de trabalho.

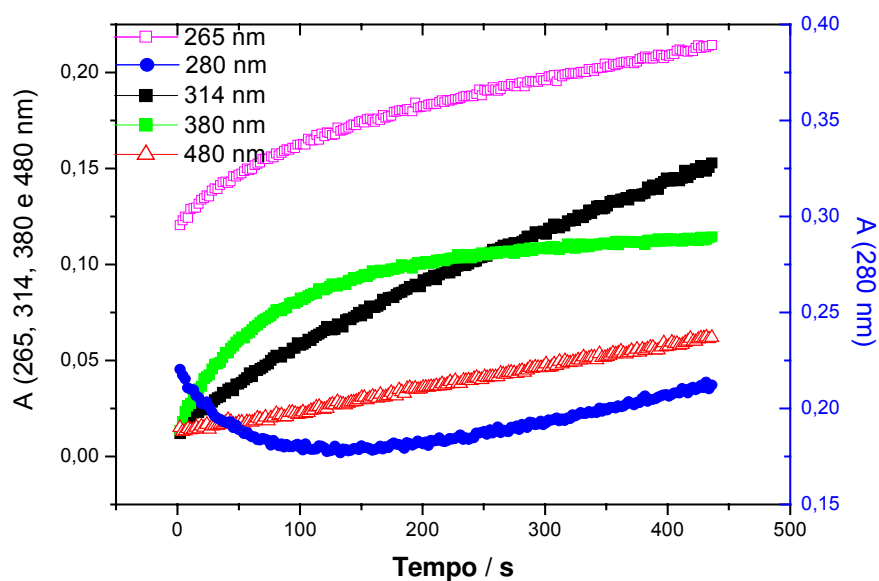


Figura 4.25 - Variação da absorbância em função do tempo para o processo redox da DA na presença de citrato (pH 5,0); E: 0,70 V.

Por meio da **Figura 4.25** é possível verificar dois comportamentos diferentes: (i) diminuição da banda em 280 nm e aumento não linear das bandas em 265 e 380 nm em função do tempo, processo semelhante ao apresentado pela DA no mesmo valor de pH na ausência de citrato (**Figura 4.19, pág. 62**) e (ii) aumento linear em função do tempo das bandas em 314 nm e 480 nm. Estes resultados sugerem que mais de um produto de oxidação é formado durante o processo de amperometria. As bandas em 314 e 480 nm provavelmente são decorrentes da interação do citrato com produtos de oxidação da DA (DC1), uma vez que estas não foram observadas para a DA na ausência do citrato.

Para pH 6,0 (**Figura 4.24.3**) observa-se que ocorre uma mudança em ambos os sistemas, ou seja, o comportamento espectroeletroquímico da DA foi

alterado, tanto na presença de citrato como na presença de EDTA. A **Figura 4.24.3** mostra que o perfil espectrofotométrico dos dois sistemas é semelhante durante o processo redox da DA, sendo que a banda em 265 nm apresentada na ausência de carboxilatos praticamente não existe mais. A banda referente a DA (280 nm) aumenta com o decorrer do processo redox, indicando que os produtos de oxidação da DA na presença de carboxilatos (citrato ou EDTA) apresentam os mesmos grupos cromóforos, mas com maior absorvidade molar (ϵ). A banda em 315 nm permanece, só que bem mais intensa, sugerindo a formação de um composto diferente do que aqueles formados pelos produtos de oxidação da DA na ausência de compostos carboxílicos. Ainda, os espectros revelam outra banda em 480 nm (banda esta observada na presença de citrato em pH 5,0). Esta mudança de comportamento da DA na presença dos dois carboxilatos pode ser correlacionada ao pK_a apresentado por essas substâncias (citrato pK_{a3} : 6,39 e EDTA pK_{a3} : 6,16), o que está de acordo com os resultados apresentados pelos estudos eletroquímicos, que sugerem que para que ocorra a interação entre os carboxilatos e os produtos de oxidação da DA ou da própria DA, estes precisam apresentar 3 grupos carboxílicos desprotonados por molécula.

No pH 7,0 (**Figura 4.24.4**) é possível verificar que o comportamento eletroquímico da DA na presença de EDTA é semelhante àquele observado na presença de citrato. Na presença de EDTA o sistema apresenta menor reversibilidade, pois se verifica que no espectro referente ao E_f (término da varredura reversa, linha em verde) o consumo dos produtos formados no caso do sistema com EDTA é menos evidente que no sistema com citrato (**Figuras 4.24.4a e 4.24.4b**). Quando esse processo redox é conduzido na presença de EDTA (**Figura 4.24b**) o espectro referente ao E_f é muito semelhante ao espectro referente ao E_{inv} , indicando uma estabilidade maior dos produtos formados e menor reversibilidade do sistema. Este fato também foi observado nos voltamogramas cíclicos (**Figura 4.26**), onde a razão entre as correntes dos picos anódico e catódico para a DA na presença de citrato é menor e mais próxima à unidade (1,43) do que a registrada para a DA na presença de EDTA (2,88). Esses resultados sugerem que os produtos formados da interação entre o EDTA com 3

carboxilas desprotonadas e os produtos de oxidação da DA ou a própria DA são mais estáveis que os formados com o citrato, o que vem a confirmar e explicar a maior eficiência do EDTA no impedimento dos fenômenos de passivação de eletrodos sólidos.

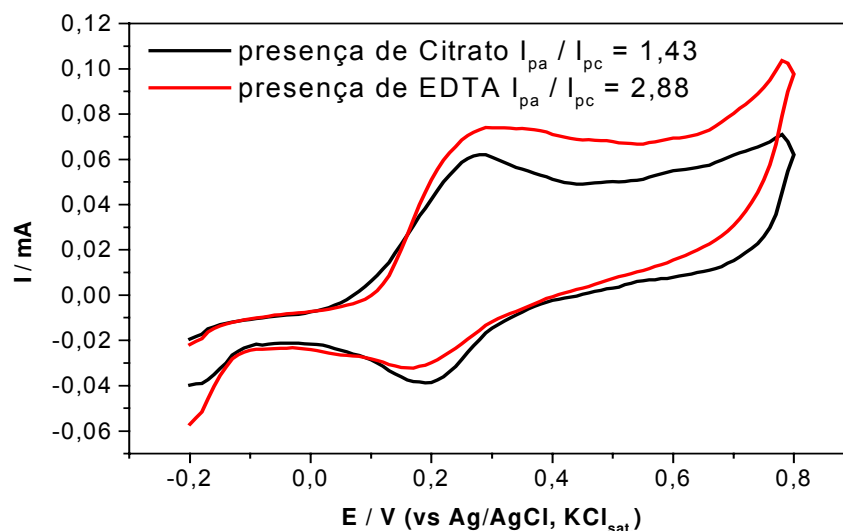


Figura 4.26 - Comportamento eletroquímico da DA $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de citrato ou EDTA $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. E_i : -0,20 V; E_{inv} : 0,80 V; E_f : -0,20 V; v : 2 mV s^{-1} .

Com relação aos estudos amperométricos, estes apresentaram mesmo comportamento para ambos os sistemas, onde todas as bandas com máximos de absorvância apresentaram tendências semelhantes, indicando que a formação do(s) produto(s) de oxidação da DA na presença de carboxilatos apresentam mesmo comportamento cinético.

Para os estudos realizados em pH 8,0 não foram encontradas diferenças significativas em relação àquelas observadas em pH 7,0. Provavelmente esse comportamento está relacionado ao número de carboxilas desprotonadas do carboxilato, o que não sofre variação pela mudança de pH de 7,0 para 8,0, tanto para o citrato como para o EDTA. Em ambos os casos a predominância é de compostos carboxílicos com três grupos desprotonados por molécula.

Posterior a avaliação destes dois carboxilatos, foram realizados estudos para a DA na presença de acetato, EGTA, NTA e DTPA, nas mesmas condições experimentais empregadas para o EDTA e citrato. Resultados semelhantes foram encontrados, onde a variação dos espectros pode ser correlacionada às espécies iônicas dos carboxilatos em solução (equilíbrio ácido-base).

Para o EGTA (**Figura 4.27**) e NTA (**Figura 4.28**) verifica-se que ocorre uma diferença significativa do comportamento espectroeletroquímico quando o pH do meio se aproxima do pK_a de dissociação da terceira carboxila da molécula, ou seja, comportamento similar ao que foi observado para o EDTA e citrato.

Já para o DTPA (**Figura 4.29**) esta variação de comportamento ocorre somente quando o pH se aproxima do pK_a de dissociação da quarta carboxila. Essa diferença pode ser decorrente da geometria da molécula, sendo que quando apenas três carboxilas estão desprotonadas a interação entre o DTPA e DA não é favorecida.

No caso do acetato (**Figura 4.30**) (pK_a 4,74) a alteração do comportamento espectroeletroquímico foi verificada para pH maior que 5,0, o que pode ser justificado por este apresentar somente uma carboxila em sua estrutura, fazendo-se necessário uma proporção de moléculas desprotonadas maior que de moléculas protonadas, visto que no pH no valor de pK_a , este carboxilato apresenta cerca de 50% de suas moléculas desprotonadas.

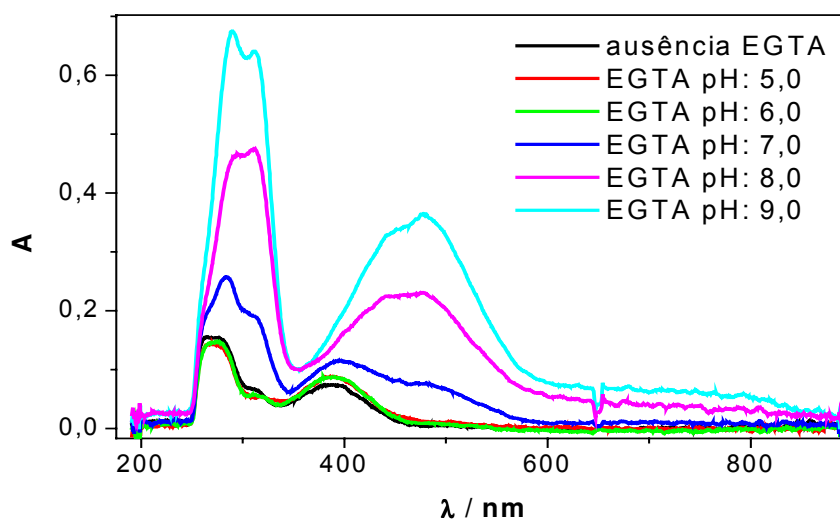


Figura 4.27 - Espectros da DA na ausência e presença de EGTA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V. DA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

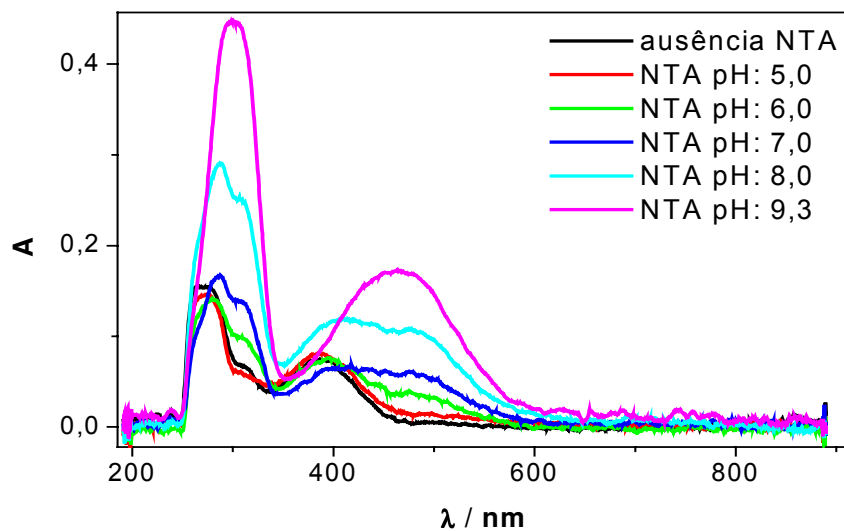


Figura 4.28 - Espectros da DA na ausência e presença de NTA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V. DA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

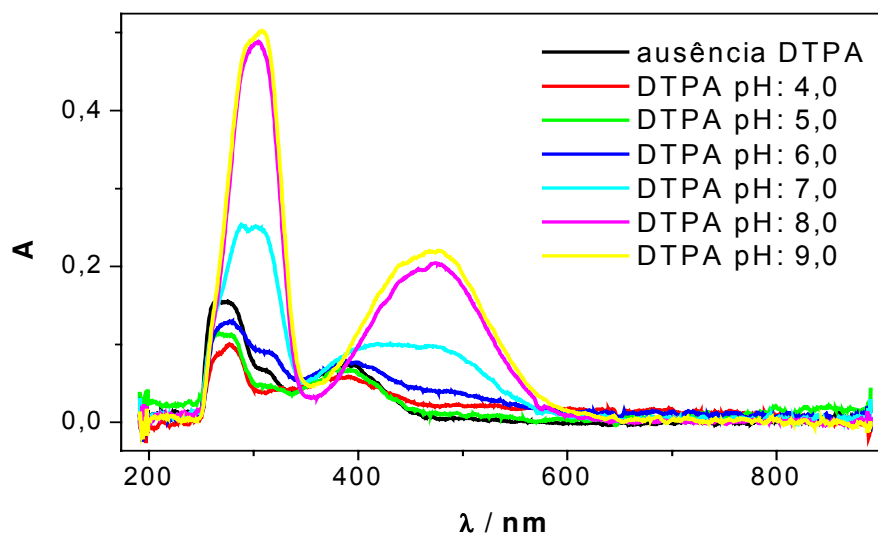


Figura 4.29 - Espectros da DA na ausência e presença de DTPA em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V. DA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

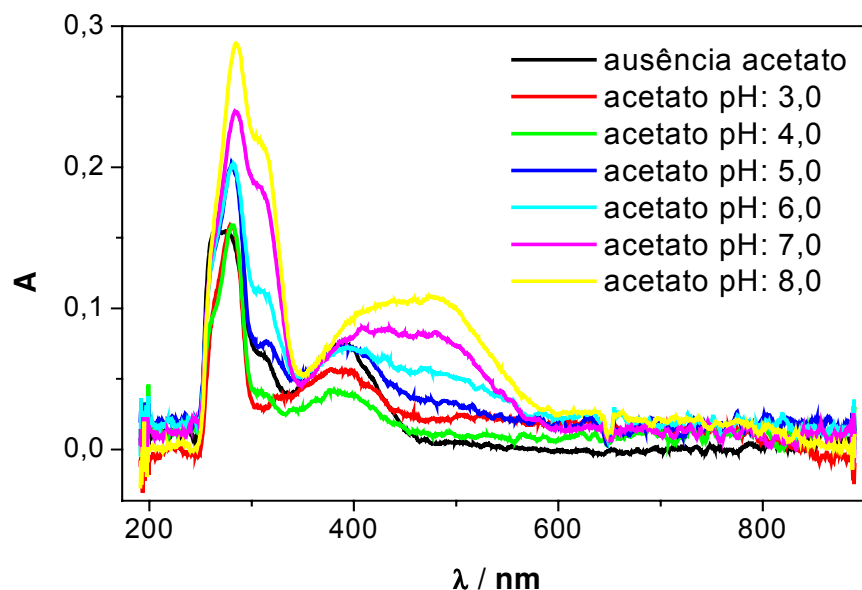


Figura 4.30 - Espectros da DA na ausência e presença de acetato em diferentes valores de pH, aplicando um potencial constante de 0,80 V. DA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

2.3.3. Estudo comparativo entre o espectro eletrônico teórico com os resultados experimentais na avaliação da interação entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação da DA

Após avaliar o comportamento da DA por SEC na ausência e presença de diferentes carboxilatos em diferentes valores de pH, foi possível observar que o comportamento é dependente do pH do meio e da estrutura do composto carboxílico. A alteração do comportamento eletroquímico da DA é verificada quando o pH do meio se aproxima da terceira constante de dissociação do ácido carboxílico, com exceção para o DTPA e o acetato.

Foi possível verificar que todos os compostos carboxílicos apresentaram mesmo comportamento quando são avaliadas as bandas originadas durante o processo de oxidação da DA na presença dos mesmos. Uma vez que as bandas são muito próximas quando se avalia os comprimentos de onda de máxima absorbância, se pode propor que a alteração que ocorre devido à interação dos compostos carboxílicos desprotonados no processo de oxidação da DA apresenta o mesmo tipo de ligação entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação da DA.

Como citado anteriormente, existe uma proposta de interação entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação da DA, que vem a ser a formação de uma nova espécie que ocorre da reação entre o leucodopaminocromo (LDC) e o composto carboxílico por meio de ligações de hidrogênio. Para avaliar esta hipótese foram também simulados os espectros para essas estruturas.

Inicialmente, foram avaliados os espectros teóricos dos compostos de interação entre o leucodopaminocromo (provável produto de oxidação da DA) e compostos carboxílicos. Estes estudos foram realizados utilizando citrato, acetato e EDTA. As estruturas tridimensionais de cada par LDC-carboxilato, assim como os máximos de absorbâncias estimados, estão apresentados a seguir.

O primeiro par avaliado foi o da interação do citrato com o LDC, onde a espécie proposta encontra-se apresentada na **Figura 4,8, pág. 47**. Os resultados dos espectros para melhor avaliação e comparação se encontram apresentados na **Tabela 4.5**.

Por meio da **Tabela 4.5**, é possível observar a concordância entre os máximos de absorbância das bandas do espectro eletrônico teórico simulado com os dados obtidos experimentalmente. Cabe destacar que as bandas presentes nos espectros obtidos experimentalmente são muitas vezes largas, onde possivelmente existe uma sobreposição de bandas. Por esse motivo, por exemplo, não foi possível estabelecer uma correlação entre as bandas em 396,2 e 404,8 nm.

Por meio deste estudo comparativo é pertinente destacar que as bandas que anteriormente não apareciam nos gráficos do estudo espectroeletroquímico da DA são justificadas por meio da simulação dos espectros teóricos. Um outro fator que vem confirmar esta proposta de estrutura entre o citrato e o LDC vem a ser o aumento significativo da absorbância da banda referente a DA livre que ocorre em aproximadamente 280 nm. Esta banda diminui quando a DA é oxidada na ausência de citrato ou na presença de citrato em baixos valores de pH. Os produtos de oxidação da DA no tratamento teórico não apresentam absorção entre 280 e 290 nm.

Quando é avaliado o composto resultante da interação entre citrato e DA por meio da espectroeletroquímica, verifica-se que para o citrato completamente desprotonado, a banda com máximo de absorbância em aproximadamente 280 nm aumenta consideravelmente. Este fenômeno se deve provavelmente à formação da espécie proposta, a qual apresenta uma banda de absorção teórica para o comprimento de máxima absorbância em aproximadamente 281 nm.

Tabela 4.5. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletroquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre citrato e LDC.

λ teórico (nm)	λ experimental (nm)
270	268
281	287
315	310
396	---
405	---
430	429
482	481

Os resultados obtidos para o acetato e o LDC estão apresentados na **Figura 4.31** e **Tabela 4.6**.

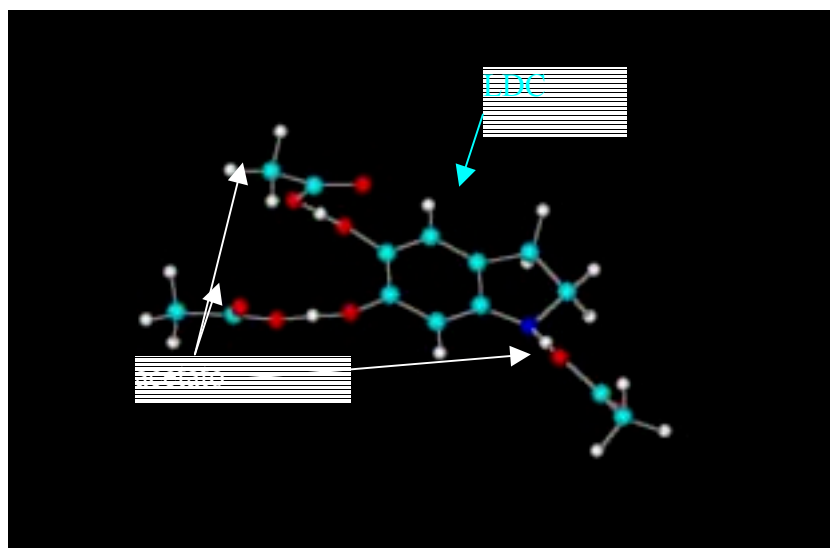


Figura 4.31 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o acetato. (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) nitrogênio.

Tabela 4.6. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletroquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre acetato e LDC.

λ teórico (nm)	λ experimental (nm)
260	260
278	283
307	307
398	---
421	425
472	473
488	---

É possível observar que as bandas decorrentes das interações com o acetato e o citrato (**Tabela 4.6**) são coincidentes entre o espectro eletrônico teórico e experimental, justificando a provável estrutura apresentada na **Figura 4.31**.

Durante a avaliação dos resultados foi verificado que a DA na presença de acetato apresenta comportamento espectroeletroquímico semelhante aos demais compostos carboxílicos, mas este fenômeno não foi observado quando foi avaliado apenas o comportamento eletroquímico da DA na presença do acetato, comparado aos demais compostos carboxílicos. Uma das hipóteses mais prováveis para este fenômeno é justificada pela diferença na estrutura do acetato com os demais compostos carboxílicos. O acetato é o único composto dentro os avaliados que apresenta somente um grupo carboxila em sua estrutura. Isso faz com que sejam necessárias três moléculas de acetato para interagir com uma molécula de LDC, o que justificaria uma menor estabilização do composto formado. O citrato quando interage com o LDC, apresenta três ligações de hidrogênio na mesma molécula, o que seria responsável pela maior estabilidade

do composto de interação resultante. Este fenômeno pode justificar o motivo pelo qual ocorre uma alteração no comportamento eletroquímico da DA na presença dos diferentes compostos carboxílicos. Este comportamento não é observado quando avaliamos o comportamento eletroquímico, onde somente pequenas variações ou nenhuma variação ocorreram durante a avaliação dos diferentes compostos carboxílicos. Por meio desta hipótese, verifica-se a necessidade de uma avaliação mais detalhada da estereoquímica dos compostos.

O próximo composto avaliado foi o EDTA:LDC. O EDTA, como já mencionado nos estudos anteriores, foi o que provocou maior alteração no comportamento eletroquímico da DA. No entanto, quando foi avaliado o comportamento espectroeletroquímico da DA na presença de EDTA, este apresentou comportamento semelhante ao dos demais compostos carboxílicos.

O EDTA devido sua estrutura poderia apresentar diferentes sítios para promover ligações de hidrogênio, apresentando as carboxilas desprotonadas e os nitrogênios presentes em sua estrutura. Verificando esta característica do EDTA, duas estruturas distintas da nova espécie formada entre o EDTA e o LDC foram propostas, para posteriormente serem avaliadas. Os espectros eletrônicos teóricos para ambas estruturas (**Figura 4.32** e **Figura 4.33**) foram estimados e seus resultados encontram-se apresentados na **Tabela 4.7**.

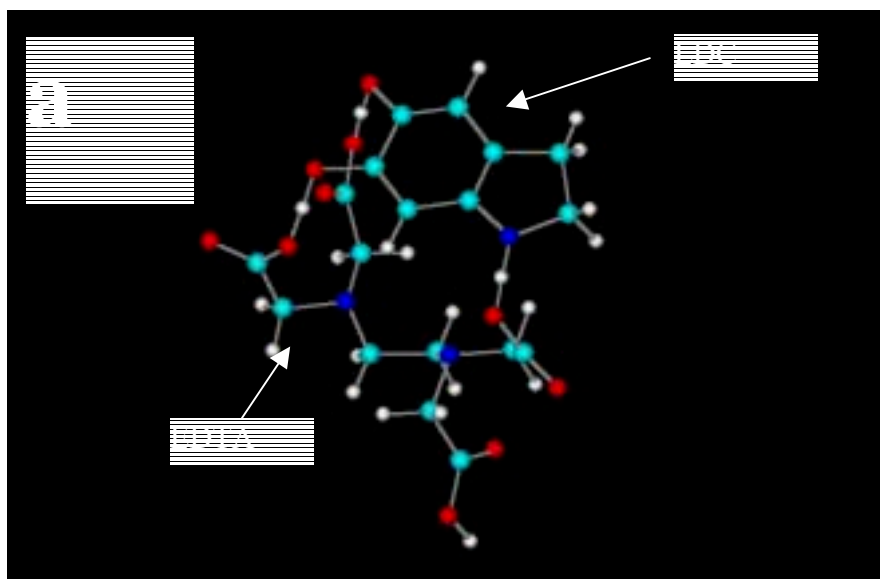


Figura 4.32 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o EDTA por meio de ligações de hidrogênio realizadas somente por meio das carboxilas. (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) nitrogênio.

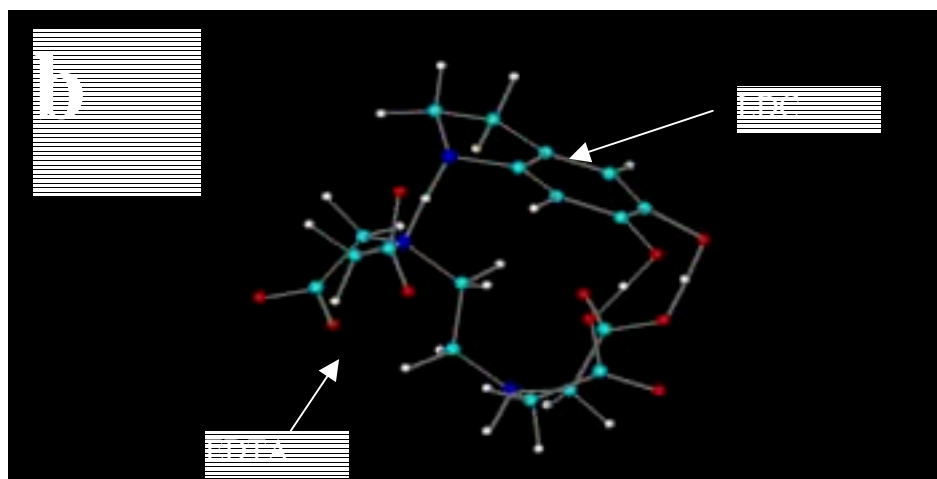


Figura 4.33 – Proposta da estrutura de interação entre o produto de oxidação da dopamina (leucodopaminocromo) e o EDTA por meio de ligações de hidrogênio realizadas pelos nitrogênios e carboxila. (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) nitrogênio.

Tabela 4.7. Correlação entre as bandas apresentadas no estudo espectroeletroquímico com comprimentos de onda de absorção apresentados no espectro eletrônico teórico para a espécie proposta entre EDTA e LDC.

λ teórico (nm)	λ teórico (nm)	λ experimental (nm)
Figura 4.31 (LDC:EDTA a)	Figura 4.32 (LDC:EDTA b)	
259	---	261
286	287	290
---	292	
---	317	312
352	---	---
354	---	---
---	475	475

Conforme os resultados apresentados na **Tabela 4.7** verifica-se que as bandas estimadas teoricamente para a espécie LDC:EDTA b são mais próximas das bandas observadas no espectro obtido por SEC para a DA na presença de EDTA. No entanto, cabe destacar que a banda em 260 nm é referente a espécie LDC:EDTA a. Estes resultados indicam que ambas as espécies podem estar presentes em solução, mas com uma predominância do composto LDC:EDTA b.

2.3.4. Avaliação estereoquímica da interação entre os compostos carboxílicos e o leucodopaminocromo

Os estudos realizados indicam que a estabilidade do produto de interação entre o composto carboxílico e o produto da DA oxidada é dependente de vários fatores. As informações obtidas pelos estudos eletroquímicos utilizando eletrodo de mercúrio (HMDE), estudos eletroquímicos utilizando eletrodo de platina e os

estudos espectroeletroquímicos fornecem informações importantes sobre essa interação.

h) Estudos eletroquímicos com HMDE

Durante os estudos do comportamento eletroquímico da DA na presença de diferentes compostos carboxílicos com propriedades não quelantes sobre a superfície do eletrodo de mercúrio, foi verificado que a maioria dos compostos carboxílicos avaliados não modificou o comportamento eletroquímico da DA.

Mas quando foram avaliados o citrato e EDTA, foi verificado que estes compostos levaram a uma alteração no comportamento redox da DA, originando uma nova espécie eletroativa estável na escala de tempo empregada. A estabilidade desta nova espécie é dependente da estrutura do carboxilato. A espécie formada com EDTA apresentou um $E^{0'}$ mais negativo quando comparado com a espécie formada com citrato, além de apresentar uma corrente, tanto catódica quanto anódica, maior. Estes resultados indicam que a espécie formada durante o processo redox da DA com EDTA apresenta maior estabilidade do que a espécie formada com citrato.

i) Estudos eletroquímicos com platina

O principal efeito avaliado no eletrodo de platina foi a diminuição do efeito de passivação do eletrodo sólido, fenômeno este que é decorrente do processo redox da DA, levando a formação de espécies poliméricas.

É possível ordenar os compostos carboxílicos quanto à eficiência em inibir a passivação do eletrodo durante o processo redox da DA. Da menor para a maior eficiência temos a seguinte ordem: EGTA (50%) (mesmo valor de passivação da DA na ausência de compostos carboxílicos) < citrato (45%) < DTPA (36%) = acetato (36%) < NTA (27%) < EDTA (5%) (pág. 52). Os números entre parênteses significam a percentagem de redução da corrente inicial do pico anódico referente ao processo de oxidação da DA,

após 20 ciclos consecutivos. Quanto menor esse valor, menor é a perda da superfície ativa do eletrodo.

j) Estudos espectroeletroquímicos

Durante os estudos espectroeletroquímicos foi verificado que as interações entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação da DA ocorrem por meio de ligações de hidrogênio, onde as carboxilas desprotonadas se ligam a amina ciclizada e ao grupo catecol do leucodopaminocromo.

Uma característica importante que foi evidenciada mediante comparação dos resultados experimentais com os espectros teóricos é que para os compostos aminocarboxílicos, avaliado por meio dos estudos com EDTA, as ligações de hidrogênio ocorrem preferencialmente com o nitrogênio da amina e não com o oxigênio da carboxila.

Após avaliar as características e resultados de cada estudo pertinente a este tópico, foi verificado que a estrutura dos compostos carboxílicos é determinante na interação com os produtos de oxidação das aminas biogênicas.

Comparando os resultados obtidos em pH 8,0, foi verificado que os compostos aminocarboxílicos apresentam uma interação mais forte com os produtos de oxidação das aminas biogênicas do que os demais carboxilatos avaliados, com exceção do EGTA. No entanto, é importante considerar que o EGTA em pH 8,0, apresenta seus dois grupos amina protonados, não permitindo que estes realizem ligações de hidrogênio, apresentando assim um comportamento de um composto carboxílico sem nitrogênio.

O citrato apresenta uma estrutura favorável que permite a interação com o LDC, mas sua cadeia de tamanho pequeno provoca um impedimento estérico que faz com que suas ligações de hidrogênio sejam muito fracas, não permitindo a inibição do processo de passivação. Isso não ocorre com o EDTA, que a partir de pH 6,0 apresenta um nitrogênio desprotonado, realizando uma ligação mais forte com o LDC e apresenta uma estrutura que fornece uma rigidez maior a molécula, o que vai atribuir as características observadas anteriormente: minimizar com maior eficácia o processo de passivação; interagir com o LDC formando uma

espécie mais estável sobre o eletrodo de mercúrio e diminuir a reversibilidade do sistema constatada nos estudos espectroeletroquímicos.

Quanto aos demais compostos carboxílicos, como acetato e oxalato, estes apresentam estruturas que não permitem que apenas uma única molécula do composto estabilize o LDC, necessitando de duas ou mais moléculas.

2.4. Estudo espectroeletroquímico das demais aminas biogênicas na presença de compostos carboxílicos

Após avaliar o comportamento espectroeletroquímico da DA na presença de diferentes carboxilatos, fez-se necessário avaliar como as outras aminas biogênicas, entre essas EP, NEP, L-dopa e ST se comportam na presença dos compostos carboxílicos durante a varredura de potencial (voltametria cíclica).

Como já verificado nos estudos anteriores, o comportamento de compostos carboxílicos contendo nitrogênio na sua estrutura difere dos compostos carboxílicos sem nitrogênio. Por esse motivo dois compostos carboxílicos foram avaliados nesse estudo: citrato (sem nitrogênio) e EDTA (com nitrogênio). Esses estudos foram conduzidos em pH 8,0, uma vez que neste pH já não se observaram mais variações para o processo redox da DA.

Para melhor compreensão dos resultados, foi avaliada cada amina biogênica separadamente. Posteriormente, foi realizado um estudo comparativo entre elas, incluindo a DA.

2.4.1. L-dopa na presença e ausência de EDTA ou citrato

A L-dopa apresenta um comportamento eletroquímico semelhante ao da DA, o que se justifica pela semelhança estrutural. Os espectros UV-Vis da L-dopa na ausência de compostos carboxílicos durante a varredura de potencial estão apresentados na **Figura 4.34**. Para fins de comparação, esse estudo, assim como

os outros envolvendo as demais aminas biogênicas, foram realizados sob a mesma condição experimental empregada anteriormente para a DA.

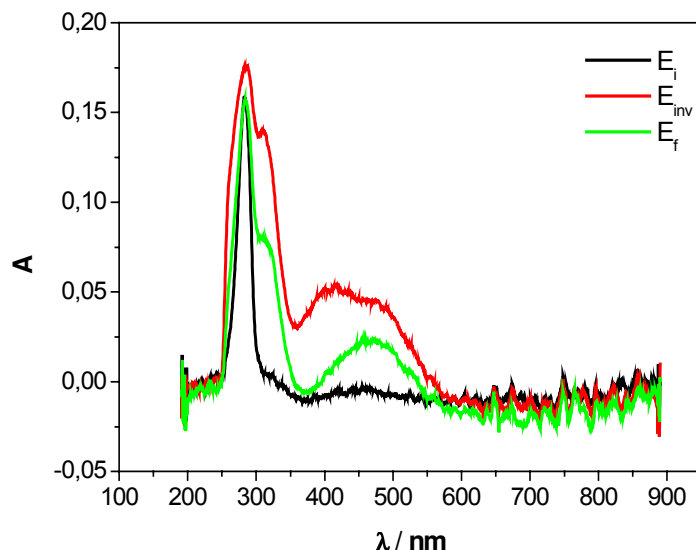


Figura 4.34 - Espectros da L-dopa em função do potencial aplicado (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). L-dopa $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, KNO₃ 1,0 mol L⁻¹, pH: 8,0, v : 2 mV s⁻¹.

Através da **Figura 4.34** é possível verificar que a L-dopa apresenta antes de sua oxidação (**Figura 4.34**, E_i) duas bandas características, uma de baixa absorvidade em aproximadamente 320 nm e uma outra em 285 nm. Durante a oxidação, verifica-se que outras bandas surgem, bandas essas que apresentam máximos de absorbância em 260, 415 e 470 nm. Quando ocorre o processo redox da L-dopa, é possível verificar que a banda em 285 nm praticamente permanece inalterada, indicando que seus produtos de oxidação continuam absorvendo nesta região do espectro e apresentam absorvidades molares semelhantes.

Durante a varredura catódica foi verificado que o produto de oxidação da L-dopa, que absorve em 470 nm, apresenta uma menor reversibilidade quando comparado com o produto que é responsável pela banda em 415 nm. Esses

resultados indicam que duas ou mais espécies estão presentes na camada de difusão (**Figura 4.34**).

O comportamento SEC da L-dopa também foi avaliado na presença de citrato ou de EDTA (**Figura 4.35**).

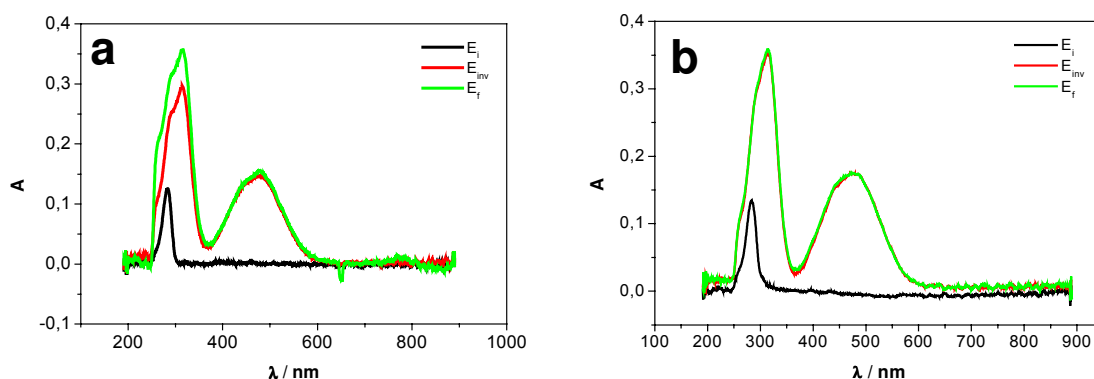


Figura 4.35 – Espectros da L-dopa na presença de carboxilatos em três diferentes potenciais (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). a) Citrato; b) EDTA. L-dopa $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, KNO₃ 1,0 mol L⁻¹, carboxilato $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹, pH: 8,0, v : 2 mV s⁻¹.

Por meio da **Figura 4.35**, pode-se verificar que o comportamento SEC da L-dopa é significativamente alterado tanto pela presença do citrato como EDTA. Quando o potencial é insuficiente para provocar a oxidação da L-dopa na presença do carboxilato, apenas uma banda com um máximo de absorvância em 285 nm é observada no espectro.

Durante o processo redox da L-dopa na presença de compostos carboxílicos são formados produtos que apresentam máximos de absorvância em 260, 290, 315 e 470 nm. Esses resultados confirmam que os produtos de oxidação da L-dopa formados são diferentes quando a varredura de potencial é realizada na presença e ausência do carboxilato. Na **Figura 4.36** estão apresentados os espectros da L-dopa e L-dopa na presença de citrato ou EDTA, após aplicação de potencial de 0,80 V.

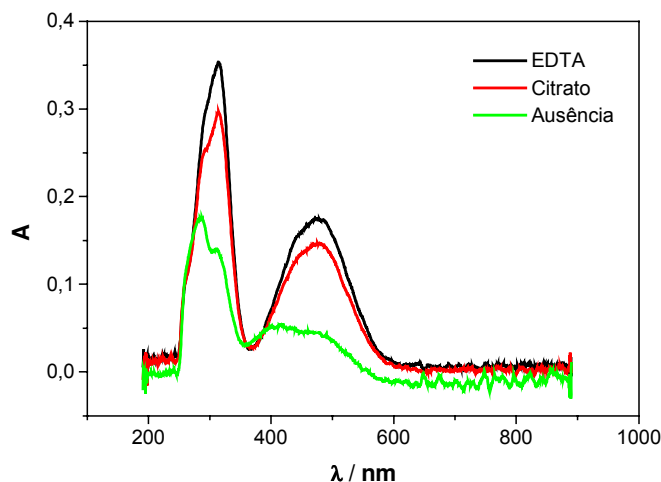


Figura 4.36 - Espectros da L-dopa (verde), L-dopa + citrato (vermelho) e L-dopa + EDTA (preto) aplicando um potencial de 0,80 V. L-dopa $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_{inv} : 0,80 V, v : 2 mV s^{-1} .

A banda característica da L-dopa em 285 nm sofre um deslocamento para 290 nm, com um aumento significativo da absorbância (composto com uma absortividade molar maior que o composto formado na ausência do carboxilato). O mesmo foi observado com a banda em 310 nm, que foi deslocado para 315 nm. A banda em 415 nm não é mais observada e a banda em 470 nm torna-se muito mais intensa, ou seja, a absorbância aumenta por mais de duas vezes quando comparada a banda em mesmo comprimento de onda na ausência de compostos carboxílicos. Estes resultados indicam que ocorre interação dos produtos de oxidação da L-dopa com os compostos carboxílicos, fato esse já observado durante os estudos eletroquímicos. É possível observar também que algumas bandas características dos produtos de oxidação da L-dopa também foram observadas para a DA, o que sugere que as principais interações neste caso também sejam decorrentes de ligações de hidrogênio. Estas interações serão mais bem discutidas durante o estudo comparativo do comportamento espectroeletroquímico entre as aminas biogênicas.

2.4.2. Norepinefrina na presença e ausência de EDTA ou Citrato

Após a avaliação da L-dopa e DA na presença e ausência de citrato ou EDTA, foi avaliado o comportamento espectroeletroquímico da NEP, composto este que apresentou comportamento eletroquímico no eletrodo de mercúrio semelhante a estas duas aminas biogênicas.

Na **Figura 4.37** são apresentados três espectros em três diferentes potências da NEP durante a varredura de potencial e, todos obtidos na ausência de carboxilatos no meio.

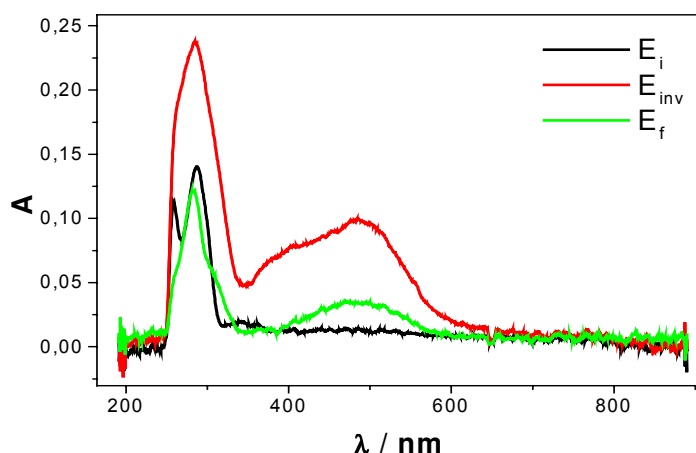


Figura 4.37 – Espectros da norepinefrina em função do potencial aplicado (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). Norepinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, v : 2 mV s^{-1} .

Anterior ao processo de oxidação da NEP duas bandas características com máximos de absorvância em 260 e 285 nm são observados. Após o início da oxidação, essas duas bandas convergem e a banda resultante apresenta uma absorvidade molar maior. Esses resultados indicam que os produtos de oxidação formados durante a varredura de potencial absorvem no mesmo comprimento de onda, no entanto com absorvidades molar diferentes. Outras três bandas são observadas durante o processo de oxidação da NEP com máximo de absorvância em 305, 405 e 485 nm.

Durante a varredura de potencial observa-se que a cinética de formação do produto responsável pela banda em 485 nm é diferente da do produto responsável pela banda em 405 nm. Enquanto a banda em 485 nm atinge um máximo de absorbância quando o potencial atinge 0,51 V, a banda em 405 nm atinge o máximo em 0,68 V. Portanto, é possível sugerir a seguinte hipótese: o composto formado que absorve em 485 nm se forma antes do composto que absorve em 405 nm, indicando que o produto que absorve em 405 nm é originário da oxidação do produto que absorve em 485 nm. Este fenômeno pode ser visualizado na **Figura 4.38**.

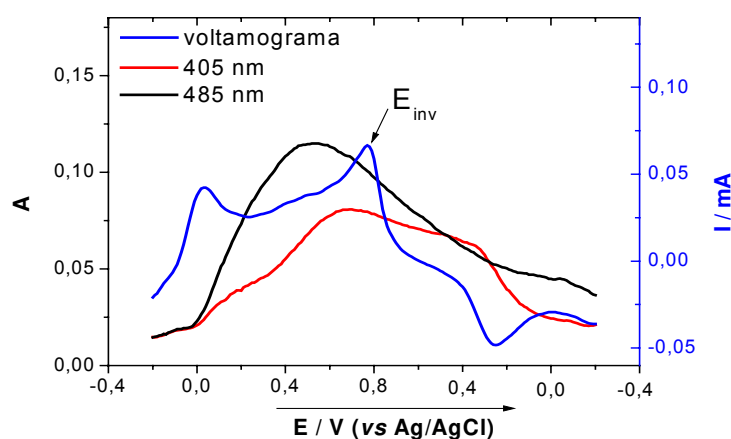


Figura 4.38 - Variação da absorbância em 405 e 485 nm e da corrente para o processo redox da norepinefrina durante a varredura de potencial. Norepinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

Em seguida foi avaliado o comportamento SEC da NEP na presença de citrato ou EDTA (**Figura 4.39**).

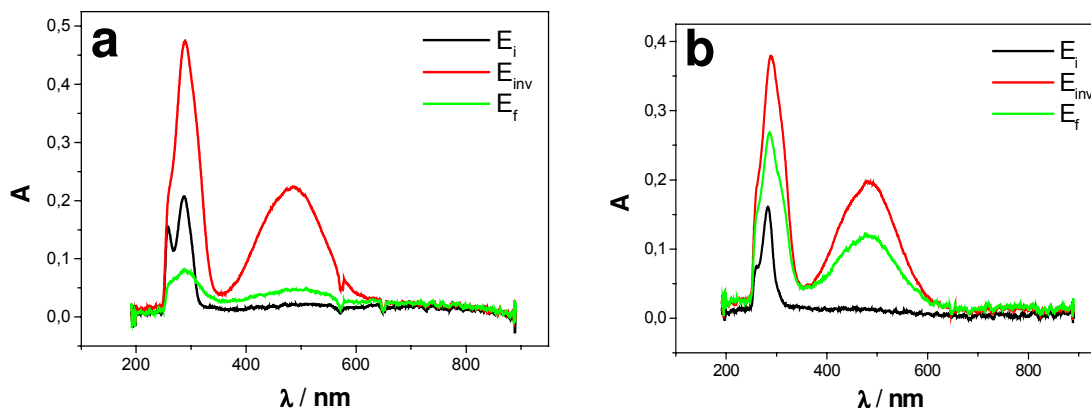


Figura 4.39 - Comportamento espectroeletroquímico da norepinefrina na presença de: a) Citrato; b) EDTA. Norepinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, ν : 2 mV s^{-1} .

Os espectros obtidos para a NEP nos três potenciais característicos na presença de citrato (**Figura 4.39 a**) ou EDTA (**Figura 4.39, b**) apresentam o mesmo perfil, com máximos de absorvância em 260, 290, 305 e 485 nm. No entanto, a reversibilidade dos sistemas é diferenciada. Na presença de EDTA os reagentes parecem ser regenerados na varredura catódica em maior extensão do que na presença de citrato (**Figura 4.39**). Isso sugere que o EDTA estabiliza o produto intermediário formado no processo redox da NEP. Este comportamento pode ser observado nos voltamogramas da **Figura 4.40**.

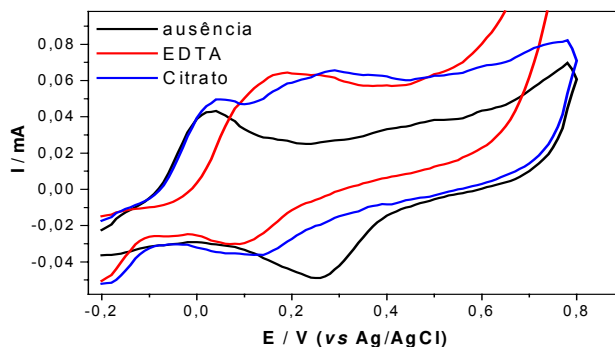


Figura 4.40 - Voltamogramas da norepinefrina na presença e ausência de citrato ou EDTA. Norepinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, ν : 2 mV s^{-1} .

Apesar da NEP apresentar as mesmas bandas no espectro UV-Vis dos seus produtos de oxidação na presença de citrato ou EDTA, esta não apresenta o mesmo comportamento eletroquímico. O EDTA favorece o processo de oxidação da NEP em uma única etapa, diferentemente do citrato onde dois picos são visualizados no voltamograma da **Figura 4.40**. O comportamento SEC da NEP na ausência de compostos carboxílicos está apresentado na **Figura 4.41**.

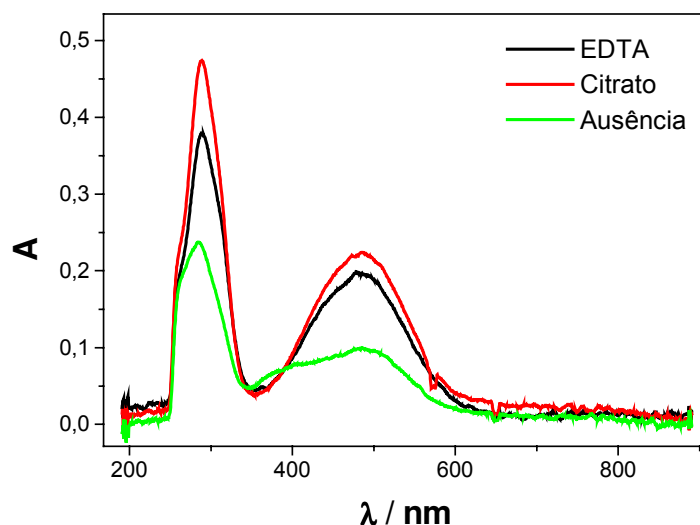


Figura 4.41 - Comportamento espectroeletroquímico da norepinefrina na presença de citrato ou EDTA. Norepinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_{inv} : 0,80 V, v : 2 mV s^{-1} .

Quando são comparados os espectros obtidos durante a aplicação do potencial de inversão da varredura cíclica (0,80 V), é possível verificar que o comportamento apresentado pela NEP é muito semelhante ao apresentado pela L-dopa, onde ocorre uma variação na intensidade de absorvância em função da presença do carboxilato no meio. Também para a NEP verifica-se o desaparecimento da banda em 405 nm.

Os resultados indicam que as interações presentes entre os produtos de oxidação da NEP e os compostos carboxílicos são do tipo ligações de hidrogênio, corroborando com os resultados anteriormente apresentados.

2.4.3. Epinefrina na presença e ausência de EDTA e Citrato

Como verificado anteriormente nos estudos eletroquímicos com eletrodo de mercúrio, a EP não apresentou variações em seu comportamento redox quando avaliada na presença e ausência de compostos carboxílicos. Para melhor avaliação das interações, o comportamento SEC da EP foi avaliado na presença e ausência de citrato e EDTA.

O comportamento SEC da EP na ausência de compostos carboxílicos está apresentado na **Figura 4.42**.

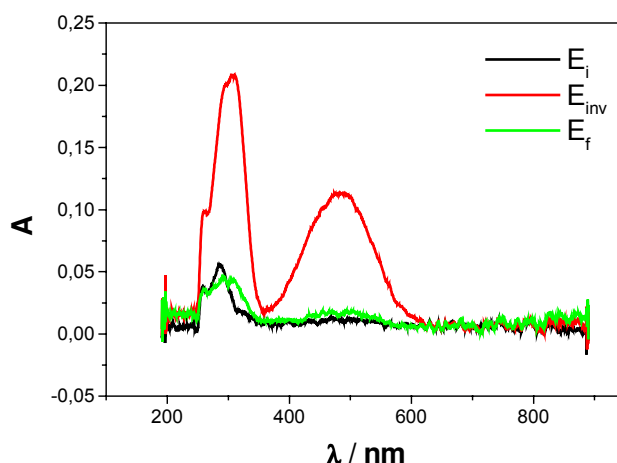


Figura 4.42 - Espectros da epinefrina em função do potencial aplicado (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). epinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, v : 2 mV s^{-1} .

Quando um potencial insuficiente para oxidar a EP é aplicado e na ausência de compostos carboxílicos foi verificada nos espectros a presença de duas bandas definidas com máximos de absorvâncias em 260 e 285 nm. Quando o processo de oxidação é iniciado, as bandas em 265 e 285 nm sofrem um aumento significativo nos valores de suas absorvâncias e duas outras bandas surgem, com máximos de absorvância em 310 e 480 nm.

O comportamento SEC da EP na presença de citrato ou EDTA estão apresentados na **Figura 4.43**. A oxidação da EP na presença de citrato ou EDTA

não leva a formação de produtos que se diferenciam nos espectros UV-Vis, uma vez que esses são praticamente sobrepostos para os potenciais característicos. Outro fato importante que deve ser destacado vem a ser que as bandas registradas para os produtos de oxidação da EP na presença de citrato ou EDTA são aparentemente as mesmas observadas para a EP na ausência de compostos carboxílicos (**Figura 4.44**).

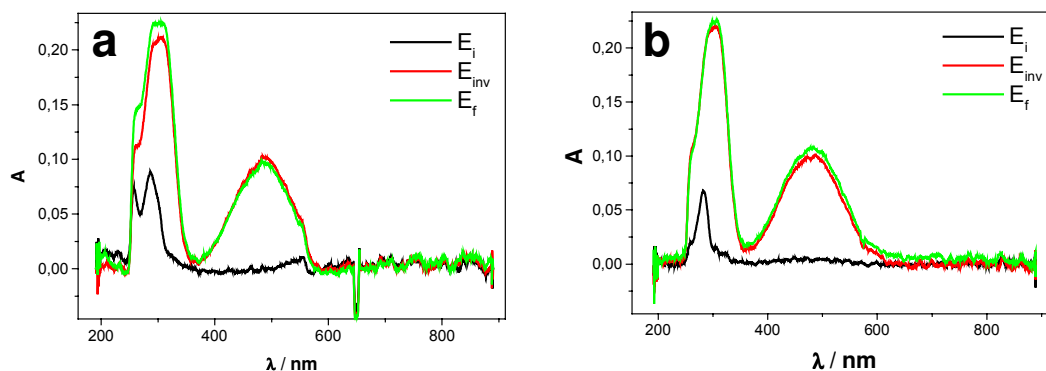


Figura 4.43 - Comportamento espectroeletroquímico da EP na presença de: a) Citrato; b) EDTA. Epinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

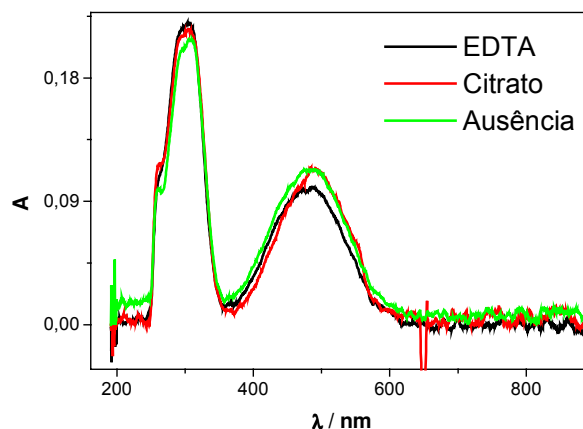


Figura 4.44 - Comportamento espectroeletroquímico da epinefrina na presença de citrato e EDTA. Epinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_{inv} : 0,80 V, v : 2 mV s^{-1} .

Os resultados sugerem que a reação de oxidação da EP na ausência do carboxilato é reversível na escala de tempo avaliada. A presença dos compostos carboxílicos afeta a reversibilidade do sistema.

O comportamento da EP no eletrodo de platina está apresentado na **Figura 4.45**.

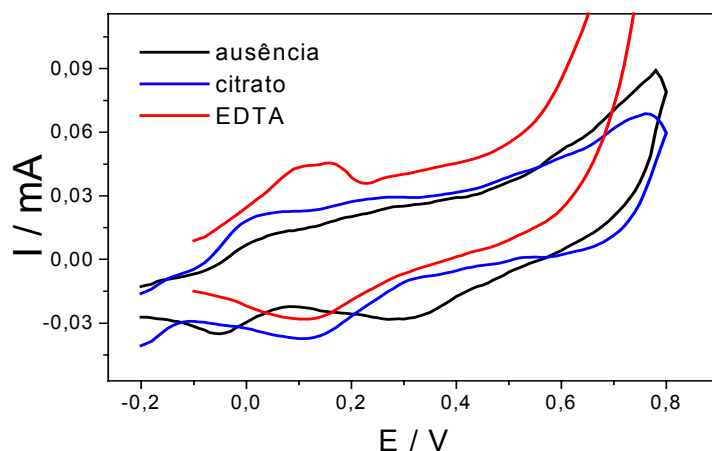


Figura 4.45 - Voltamogramas da epinefrina na presença e ausência de citrato ou EDTA. Epinefrina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

Quando foi avaliado o comportamento eletroquímico da EP na presença e ausência de compostos carboxílicos sobre a superfície do eletrodo de platina, verificou-se que este é alterado pela presença de citrato e EDTA. O efeito do EDTA sobre o perfil voltamétrico da EP é semelhante ao observado para a DA, onde o processo tende a ocorrer em uma única etapa.

2.4.4. Serotonina na presença e ausência de EDTA e Citrato

O último composto avaliado foi a ST que se diferencia das demais por não apresentar um grupo catecol em sua estrutura.

O comportamento eletroquímico da ST no eletrodo de mercúrio não evidenciou a formação de uma nova espécie eletroativa na presença de citrato como verificado para a DA, L-dopa e NEP. No entanto, a adição de EDTA também diminuiu o processo de passivação de superfície do eletrodo de platina. Cabe destacar, no entanto, que este fenômeno não foi evitado como para a DA, L-dopa e NEP e sim, apenas minimizado.

No sentido de obter mais informações sobre a ST, também foi realizado um estudo utilizando a espectroeletroquímica.

Os espectros da ST na ausência de carboxilatos durante a varredura de potencial estão apresentados na **Figura 4.46**. Através da **Figura 4.46** é possível verificar que a ST sem ser oxidada apresenta duas bandas definidas, com máximos de absorbância em 280 e 315 nm. Quando a transferência de carga se inicia, seu produto de oxidação apresenta uma nova banda com máximo de absorbância em 380 nm. Simultaneamente ocorre uma diminuição da banda em 280 nm e um alargamento da mesma com um ombro em aproximadamente 260 nm. Esse comportamento é semelhante ao observado para as outras aminas biogênicas.

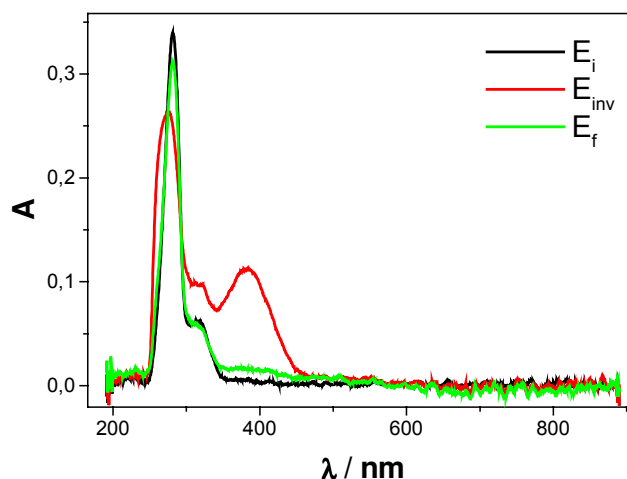


Figura 4.46 - Espectros da serotonina em função do potencial aplicado (E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V). Serotonina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, v : 2 mV s^{-1} .

Os espectros obtidos para a ST na presença de citrato e EDTA estão apresentados nas **Figura 4.47 a e b**, respectivamente.

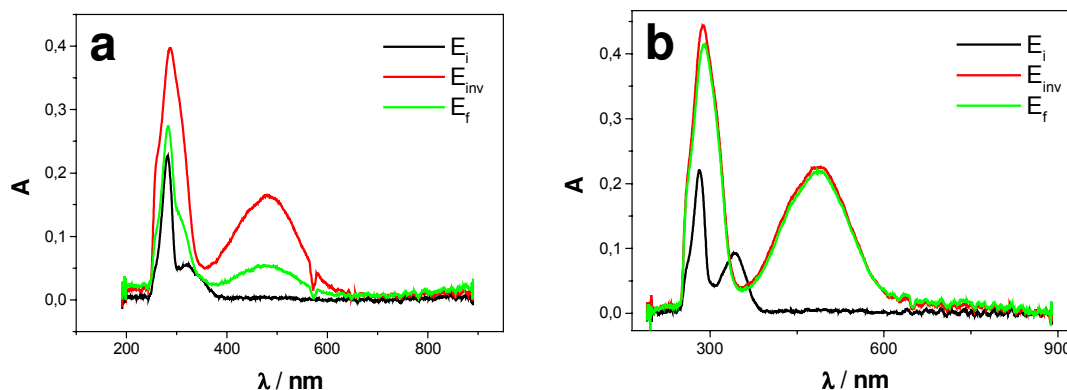


Figura 4.47 - Comportamento espectroeletroquímico da serotonina na presença de: a) Citrato; b) EDTA. Serotonina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

Os espectros a e b da **Figura 4.47**, obtidos nos três diferentes potenciais, mostram um perfil semelhante ao observado nos estudos anteriores, ou seja, os produtos de oxidação da ST na presença de compostos carboxílicos apresentam um espectro eletrônico na região UV-Vis diferente da ST na ausência dos mesmos. Este resultado indica que o mecanismo é alterado pela presença dos compostos carboxílicos no meio. Cabe destacar que não foi observada interação entre o citrato e a ST usando o eletrodo de mercúrio (formação da nova espécie eletroativa).

Ainda, na **Figura 4.47**, através do espectro referente ao potencial final (E_f), é verificado que o comportamento apresentado pela DA se repete, onde a absorbância do produto de oxidação da ST na presença de citrato (485 nm) apresenta uma maior reversibilidade quando comparada ao sistema composto por ST e EDTA. Este resultado indica que o EDTA interage mais fortemente com a ST e/ou seus produtos de oxidação do que com o citrato.

Para melhor avaliação da alteração do comportamento SEC da ST com a adição de compostos carboxílicos, os espectros referentes ao potencial de inversão (E_{inv}) foram comparados (**Figura 4.48**).

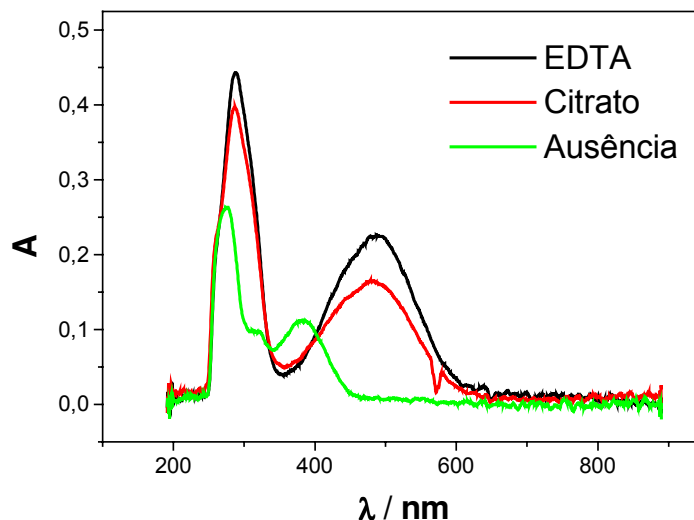


Figura 4.48 - Comportamento espectroeletroquímico da serotonina na ausência (verde) na presença de citrato (vermelho) e EDTA (preto). Serotonina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_{inv} : 0,80 V, v : 2 mV s^{-1} .

Na **Figura 4.48** verifica-se que a banda do produto de oxidação da ST na ausência de compostos carboxílicos em 380 nm não está mais presente nos espectros obtidos para a ST na presença de citrato e EDTA. Esses resultados indicam que os produtos formados são diferentes.

Verificada a influência dos carboxilatos no comportamento SEC da ST foi avaliado o comportamento eletroquímico desta usando o eletrodo de platina. Os voltamogramas da ST na ausência e presença de citrato e EDTA estão apresentados na **Figura 4.49**.

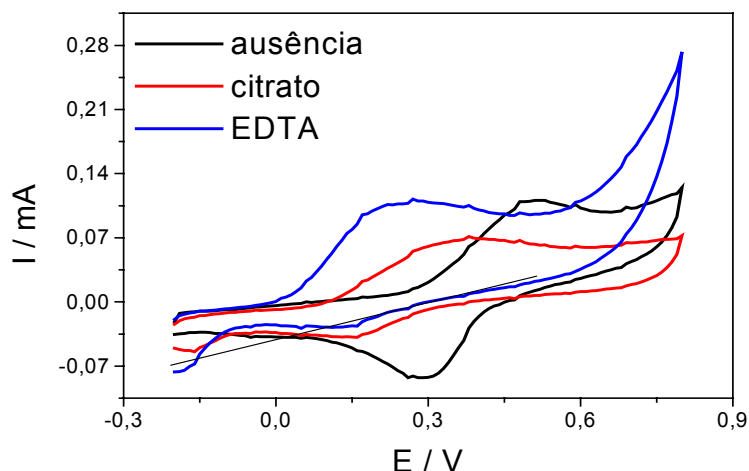


Figura 4.49 - Voltamogramas da serotonina na presença e ausência de citrato e EDTA. Serotonina $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, composto carboxílico $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

Através da **Figura 4.49** é possível observar que o comportamento eletroquímico da ST no eletrodo de Pt é alterado pela presença de compostos carboxílicos no meio, alterando tanto seu potencial de pico como a reversibilidade do sistema. O maior deslocamento de potencial de pico é observado para a ST na presença de EDTA. Ainda, verifica-se que a relação das correntes anódica/catódica também é influenciada pelo carboxilato no meio. Na presença de EDTA essa relação é máxima, ou seja, ocorre uma diminuição da corrente catódica na varredura inversa, o que indica que o processo de oxidação da ST é favorecido pelo EDTA e seu produto de oxidação é estabilizado. Embora o produto seja igualmente estabilizado pelo citrato, o EDTA deve formar um composto mais estável com o produto de oxidação da ST do que com o citrato.

2.4.5. Estudo comparativo do comportamento espectroeletroquímico de diferentes aminas biogênicas

Foi possível verificar que todas as aminas biogênicas, com exceção da EP, tiveram seu comportamento alterado pela presença dos compostos carboxílicos. A diferença essencial entre a estrutura da EP e as demais aminas biogênicas é um grupo metila ligado ao nitrogênio. Enquanto a EP é uma amina secundária, todas as demais são aminas primárias. A importância do grupo amino vem corroborar com os estudos eletroquímicos anteriormente realizados, onde foi verificado que a estabilização do produto de oxidação da amina biogênica ocorre mediante ligação de hidrogênio do grupo amino e carboxilato.

Outra característica importante é que os produtos de oxidação formados durante a varredura de potencial absorvem, de modo geral, em comprimentos de onda maiores do que as aminas biogênicas, o que indica um aumento do número de duplas ligações conjugadas.

Este fenômeno ocorre também quando adicionamos carboxilatos ao meio, onde a tendência de surgimento de bandas com maior comprimento de onda ocorre quando comparados aos sistemas sem a presença de compostos carboxílicos. A explicação deste fato se baseia também no aumento das insaturações, pois ocorre um aumento de ligações, as quais irão agregar compostos carboxílicos ao composto avaliado por meio de ligações de hidrogênio.

Devido a semelhança das estruturas da DA, NEP e L-dopa, estas apresentam comportamento semelhante quando avaliamos a reversibilidade do sistema, pois o EDTA promove uma estabilidade maior dos compostos em estudo, indicando que as interações formadas com EDTA são mais fortes do que as com citrato, resultado este já observado em estudos anteriores.

Outro fato importante observado nos estudos SEC vem a ser que a ST, mesmo não apresentando um grupo catecol, apresentou comportamento muito semelhante ao obtido para a DA, indicando que a banda com máximo de absorbância em aproximadamente 480 nm é formada por meio da interação com a

amina ciclizada presente nestes compostos com compostos carboxílicos por meio de ligações de hidrogênio.

Os estudos espectroeletroquímicos sugerem que as aminas apresentam comportamento muito semelhante durante seu processo redox, apresentando grupos cromóforos parecidos, sendo assim possível realizar um mecanismo geral de oxidação para as catecolaminas e um outro para a ST.

Como foi verificado que o comportamento das demais aminas se aproxima do comportamento apresentado pela DA, com máximos de absorbância próximos, não se realizou o estudo comparativo destes mecanismos com os espectros eletrônicos teóricos para cada amina estudada, sendo considerado o estudo realizado para a DA suficiente para a elaboração dos mecanismos envolvidos.

3. Influência de metais de transição no comportamento redox de neurotransmissores na ausência e presença de carboxilatos

Verificada a importância que os metais de transição apresentam no comportamento redox dos neurotransmissores, como citado na introdução, estes merecem destaque no estudo desta pesquisa.

3.1. Comportamento eletroquímico da dopamina em meio de citrato na ausência e presença de íons metálicos, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio

Após avaliar a interação entre os neurotransmissores e o citrato, verificou-se a necessidade de avaliar também a influência de íons metálicos no comportamento redox da dopamina na presença de citrato. A proposta de avaliar vários íons, entre eles Cu(II) e Fe(III), não foi possível nas condições

experimentais, uma vez que estes íons metálicos apresentam um par redox na faixa de potencial avaliada. Outros íons como Mn(II), Zn(II) e Al(III) não apresentaram resultados significativos e, portanto, não foram apresentados nesse capítulo.

Primeiramente, dois íons foram avaliados Ce(IV) e Hg(II). O cério foi escolhido por não formar complexos estáveis com o citrato e o mercúrio por ser um produto da oxidação eletroquímica do próprio material do eletrodo quando um potencial de +300 mV (vs Ag/AgCl) é aplicado anterior a varredura de potencial.

3.1.1. Avaliação da influência do íon Ce(IV) no comportamento eletroquímico da dopamina

Em trabalho anterior (Winter, 2003) foi verificado que o Hg(II) em solução reage com a DA na presença de citrato, levando a formação de uma nova espécie eletroativa com pico catódico e anódico em -260 e -210 mV, respectivamente. Essa nova espécie eletroativa apresenta as mesmas características do par redox observado quando se oxida a DA na superfície do eletrodo de mercúrio, mediante aplicação de potencial de +300 mV vs Ag/AgCl, KCl 3 mol L⁻¹ anterior a varredura.

No intuito de avaliar se o carboxilato exerce papel importante neste processo, foi avaliado outro elemento que possui propriedade oxidante, mas que não forma complexo estável com o citrato em solução. Para tanto, foi escolhido o Ce(IV).

Primeiramente, foi avaliada a influência do Ce(IV) e citrato no processo redox da DA, usando para tanto a voltametria cíclica, no intuito de verificar se ocorre a formação de uma substância eletroativa na presença do carboxilato em potenciais mais negativos, como observado nos estudos anteriores para o Hg(II).

É possível verificar na **Figura 4.50** que a DA na presença de citrato não apresenta pico definido no voltamograma cíclico, resultados que corroboram os estudos realizados anteriormente com o mercúrio. Posteriormente, quando íons cério são adicionados à solução, que já contem citrato e DA em meio de nitrato de potássio, ocorre a formação de um par redox em potenciais negativos, indicando

que a oxidação química da DA em solução acarreta em efeito semelhante à oxidação eletroquímica. O par redox apresenta as mesmas características, o que vem a confirmar como os estudos realizados anteriormente. Os resultados indicam que o par redox é produto da interação do citrato desprotonado e o produto da oxidação da DA.

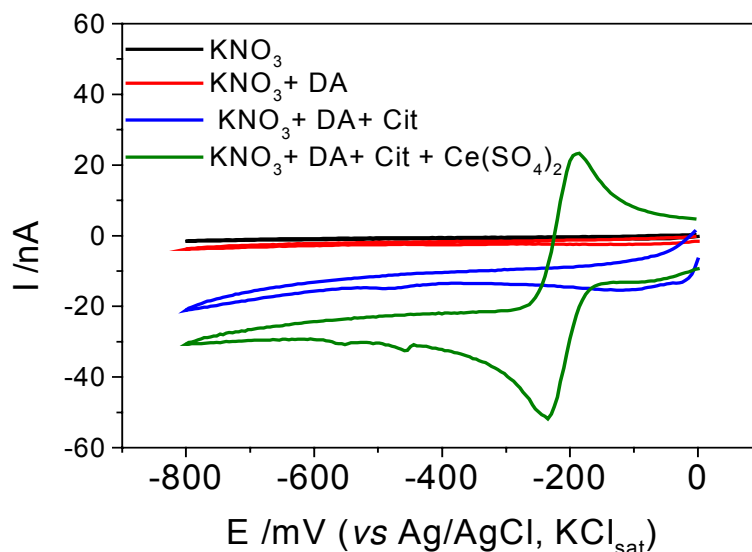


Figura 4.50 – Voltamograma Cíclico para a dopamina na presença de citrato e Ce(IV). (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ + Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; E_i : 0 mV , E_{inv} : -800 mV , E_f : 0 mV , pH: $7,5$, v : 20 mV s^{-1} .

Com o propósito de verificar se este produto responsável pelo par redox em potenciais negativos não é somente um produto de oxidação da DA, independente da ação do citrato, a ordem de adições dos reagentes foi invertida, onde primeiramente se adicionou sobre o eletrólito suporte a DA, posteriormente o Ce(IV) e por último o citrato (**Figura 4.51**).

É possível verificar que com a adição de Ce(IV) sobre a DA, um par redox não bem definido em potenciais mais negativos é formado, indicando a formação

de um produto eletroativo proveniente da oxidação química da DA. No entanto, as intensidades das correntes de pico são muito baixas. Ainda, cabe destacar que ocorre um deslocamento da linha de base, o que indica que a superfície do eletrodo de mercúrio está sendo alterada pela presença de íons Ce(IV) em solução. Com a adição de citrato, o par redox ($E^{0'}$ -220 mV) evidenciado nos estudos anteriores é formado. Esses resultados permitem estabelecer duas hipóteses: (i) o par redox formado entre a DA e Ce(IV), é um produto de oxidação da DA, que na ausência de citrato é mais difícil de ser reduzido; (ii) na presença de citrato forma-se um produto suficientemente estável para ser detectado no tempo de escala da voltametria, e que sofre redução em um potencial menor, indicando que a transferência de carga deste composto é facilitada.

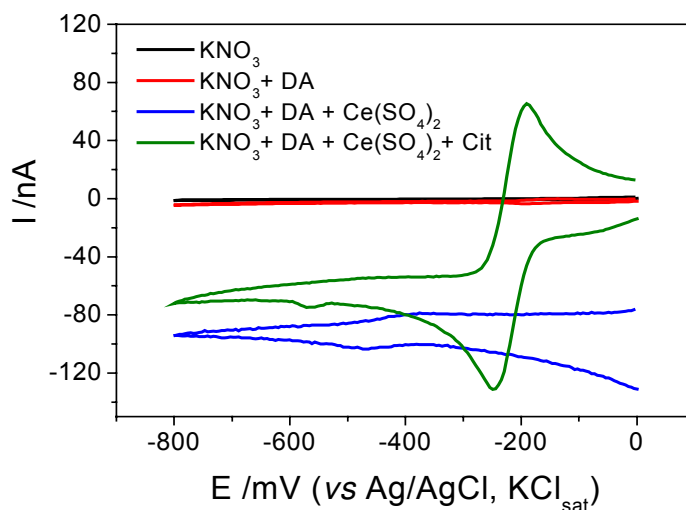


Figura 4.51 – Voltamogramas cíclicos. Avaliação do comportamento eletroquímico da dopamina com a adição de Ce(IV). (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (—) KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + citrato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$; E_i : 0 mV, E_{inv} : -800 mV, E_f : 0 mV, pH: 7,5, v : 20 mV s^{-1} .

3.1.2. Avaliação da influência pH na interação entre dopamina e citrato na presença de Ce(IV)

O produto de oxidação química da DA em solução parece ser o mesmo do que àquele formado pelo processo eletroquímico na superfície do eletrodo. Sendo assim, foi verificado se a reação também é influenciada pelo pH do meio, uma vez que a interação da espécie eletroativa com o citrato depende desta. A variação do potencial e da corrente do pico do processo catódico em função do pH é apresentado na **Figura 4.52**.

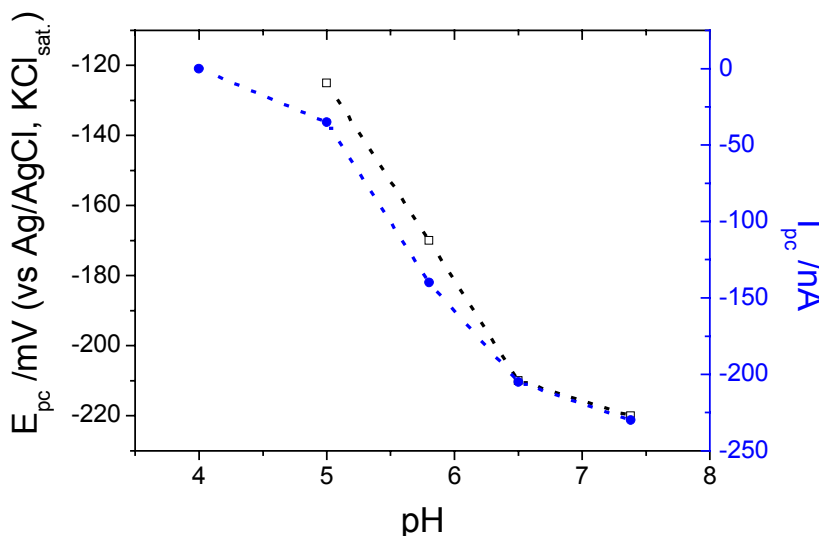


Figura 4.52 – Variação do E_{pc} e da I_{pc} do pico em função do pH. DA $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, Ce(IV) $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, Citrato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, E_i : 0 mV, E_{inv} : -800 mV, E_f : 0 mV, pH: 7,5, v : 20 mV s^{-1} .

É possível verificar na Figura 4.52 que a formação do par redox na presença de citrato e DA oxidada por Ce(IV) varia de acordo com o pH. Com o aumento do pH, ocorre um deslocamento do potencial do par redox para potenciais mais negativos, indicando a formação de um complexo mais estável. Com relação a corrente, a mesma aumenta de intensidade com o aumento do pH, indicando que a formação da espécie eletroativa é dependente da concentração

hidrogeniônica do meio. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados em relação a oxidação eletroquímica da DA, onde foi verificado que tanto o potencial como a corrente estabilizam com pH acima de 6,5 (pH superior ao terceiro pK_a do citrato (6,39)).

3.2. Estudo cinético da oxidação química da dopamina no meio de citrato ou EDTA na presença de íons metálicos por espectrofotometria

Com o intuito de obter mais informações sobre a oxidação da DA na presença de carboxilatos e íons metálicos, foi empregada a espectrofotometria. Os estudos foram conduzidos na presença de EDTA ou de citrato, os dois carboxilatos que apresentaram os maiores efeitos de interação com o processo redox da DA no eletrodo de mercúrio e de platina.

Em estudos anteriores foram avaliados vários metais de transição, onde foi constatado que íons como Cu(II), Mn(IV), Zn(II) e Al(III) não modificam a cinética da reação de oxidação da DA em meio aquoso, enquanto os íons Fe(III) e Hg(II) aceleram o processo de oxidação [Winter, 2003]. No entanto, esses estudos para serem conduzidos em pH 7,5 foram realizados em tampão citrato, o qual evita a precipitação dos hidróxidos metálicos. Sendo assim, nestes estudos não seria possível diferenciar o efeito do citrato do efeito do íon metálico na oxidação da DA.

Para contornar essa situação foram realizados estudos empregando o Ce(IV), que se diferencia dos demais elementos até então avaliados, uma vez que este não forma complexos estáveis com carboxilatos. Pelo potencial padrão do Ce(IV) e da DA evidencia-se que a reação de oxidação da DA é termodinamicamente favorável. A reação química foi monitorada em 480 nm, que é o comprimento de máxima absorbância do dopaminocromo, principal produto de oxidação da DA.

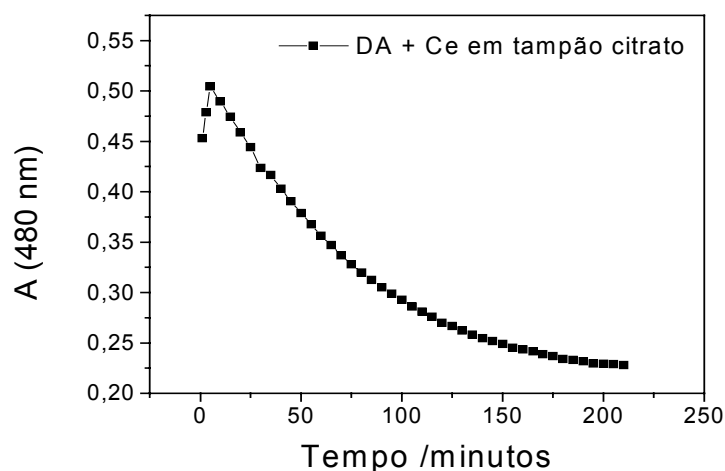


Figura 4.53 – Formação de dopaminocromo no processo de oxidação da dopamina por Ce(IV) em meio tampão citrato, pH 7,5. Dopamina $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão citrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5.

É possível verificar na **Figura 4.53** que a formação do dopaminocromo a partir da oxidação da dopamina pelo Ce(IV) segue perfil semelhante ao obtido para os outros íons metálicos (resultados não apresentados). No entanto, a reação de formação do dopaminocromo é mais rápida na presença de Ce(IV), sendo que já em 5 minutos ocorreu o máximo de formação do produto. O decréscimo da absorvância após 5 min de reação é justificado pela instabilidade do dopaminocromo em solução, onde outros produtos de oxidação são formados.

3.2.1. Estabilidade da dopamina na presença de EDTA ou citrato e influência de íons metálicos

No intuito de verificar se o citrato influencia de alguma forma na cinética de oxidação da DA na presença dos íons metálicos, foi realizado um estudo onde o citrato foi substituído pelo EDTA. Sendo assim, foi avaliada a cinética da oxidação da DA na presença de EDTA e dos íons Fe(III), Ce(IV) e Hg(II).

É possível verificar através da **Figura 4.54** que a velocidade da reação de oxidação da DA e formação do dopaminocromo é dependente do íon metálico. O Fe(III) leva a uma maior formação de dopaminocromo em menor escala de tempo. No entanto, se relacionar a inclinação da reta, anterior a estabilização dos compostos formados por Ce(IV), é possível verificar que o cério aumenta a velocidade de reação, seguido pelos íons férrico e por último o mercúrico (Ce(IV): $1,98 \cdot 10^{-3} \text{ A min}^{-1}$; Fe(III): $1,46 \cdot 10^{-3} \text{ A min}^{-1}$; Hg(II): $0,71 \cdot 10^{-3} \text{ A min}^{-1}$).

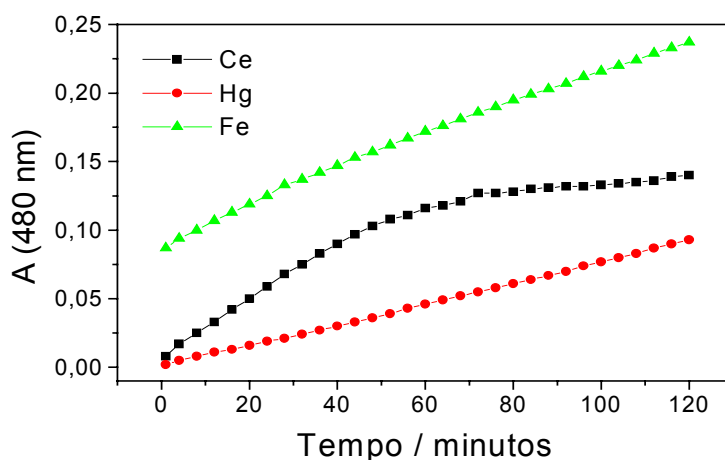


Figura 4.54 – Formação de dopaminocromo (480 nm) através da oxidação de dopamina por Fe(III), Ce(IV) e Hg(II) na presença de EDTA; Dopamina: íon metálico, soluções equimolares de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Para realizar um estudo comparativo entre as reações na presença de EDTA e citrato, visto que as condições experimentais são as mesmas, foram comparadas as curvas de absorvância (480 nm) em função do tempo, anteriormente obtidas para cada íon metálico.

Na **Figura 4.55** é possível verificar que reação de formação de dopaminocromo a partir de dopamina na presença de Ce(IV) é dependente da estrutura do carboxilato. A reação de oxidação é mais lenta na presença de EDTA do que citrato. Quando a reação ocorre em meio citrato, em apenas 5 min a reação já atinge o máximo na formação de dopaminocromo. Na presença de EDTA, onde a reação foi acompanhada por duas horas, verifica-se que a reação

de formação do dopaminocromo é lenta e contínua. Esses resultados sugerem que o EDTA promove uma estabilização da DA em solução, retardando seu processo de oxidação. Ainda, em meio de citrato o dopaminocromo formado é instável, uma vez que a absorbância em 480 nm diminui em função do tempo após 5 minutos.

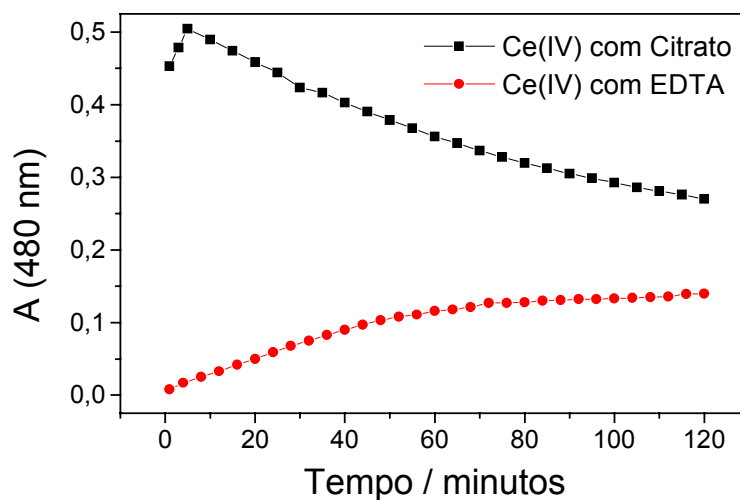


Figura 4.55 – Formação do dopaminocromo pela oxidação de dopamina por Ce(IV) na presença de citrato e EDTA. Dopamina: íon metálico, soluções equimolares de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O mesmo estudo comparativo foi realizado para o Hg(II) e para o Fe(III). Para o Hg(II) (**Figura 4.56**) foi verificado comportamento similar àquele observado para o Ce(IV) na presença de citrato ou EDTA.

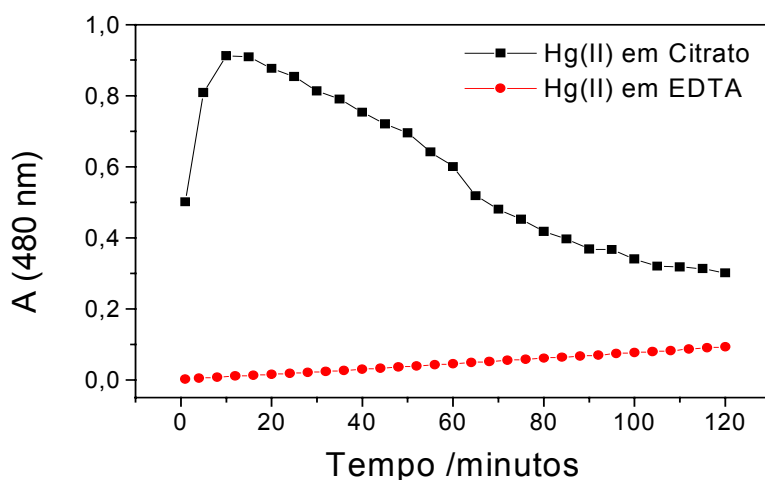


Figura 4.56 – Formação do dopaminocromo pela oxidação de dopamina por Hg(II) na presença de citrato e EDTA. Dopamina: íon metálico, soluções equimolares de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Quando avaliada a oxidação da DA pelo Fe(III) (**Figura 4.57**) foi possível verificar que a velocidade inicial de formação de dopaminocromo na presença de citrato é maior em comparação quando a reação é conduzida em meio de EDTA. No entanto, após duas horas de reação, a absorvância em 480 nm, referente à concentração de dopaminocromo em solução, praticamente é a mesma na presença de citrato ou EDTA. O comportamento da DA na presença de Fe(III) é diferenciado dos outros íons metálicos avaliados, visto que este não apresenta um máximo de formação de dopaminocromo e uma subsequente diminuição desse produto em função do tempo. Os resultados indicam que o carboxilato na presença de Fe(III) estabiliza o dopaminocromo. Ainda, a velocidade de reação de oxidação da dopamina na presença de EDTA é mais lenta.

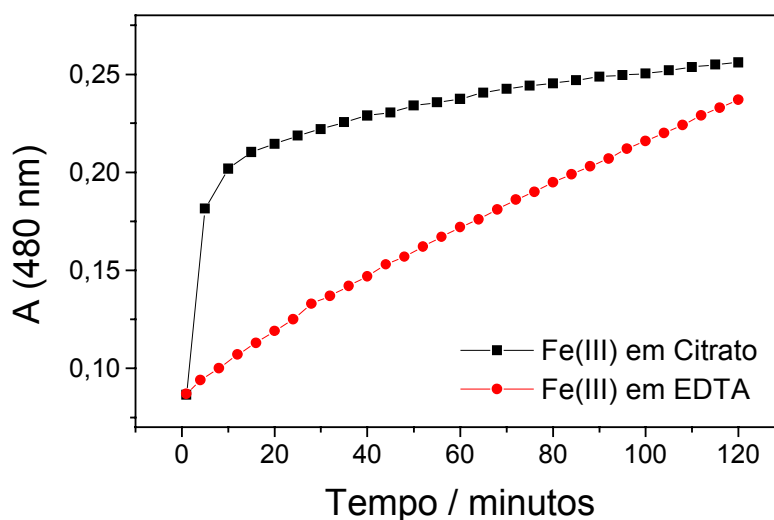


Figura 4.57 – Formação do dopaminocromo pela oxidação da dopamina por Fe(III) na presença de citrato e EDTA. Dopamina: íon metálico, soluções equimolares de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

É possível verificar que a seqüência da velocidade de reação de formação de dopaminocromo permaneceu a mesma, tanto na presença de citrato quanto na de EDTA, onde a velocidade aumenta na seguinte ordem: $\text{Hg(II)} < \text{Fe(III)} < \text{Ce(IV)}$. É interessante observar que a ordem de reação não segue a ordem dos potenciais de redução padrão para cada íon, (Hg(II) : +0,920 V; Fe(III) : 0,771 V; Ce(IV) : +1,44 V) [Skoog, *et al.*, 1998], o que indica que a estabilização de produtos intermediários é responsável pela cinética da reação.

3.3. Avaliação do comportamento espectroeletroquímico da DA na presença de metais de transição

Também se fez necessário avaliar o comportamento SEC da DA na presença de metais de transição e compostos carboxílicos simultaneamente.

Para tal, o íon metálico utilizado para o estudo em questão foi o Ce(IV) , íon este que apresenta uma menor interação com os compostos carboxílicos e não apresenta variações nos espectros na faixa de potencial avaliada (**Figura 4.58**). O

Fe(III) não pode ser avaliado, uma vez que o próprio íon apresenta redução na faixa de potencial avaliada e uma sobreposição de sinais iria ocorrer, não permitindo a avaliação independente dos resultados. O íon mercúrio também não foi avaliado neste estudo, pois o produto de redução adsorve na superfície de platina.

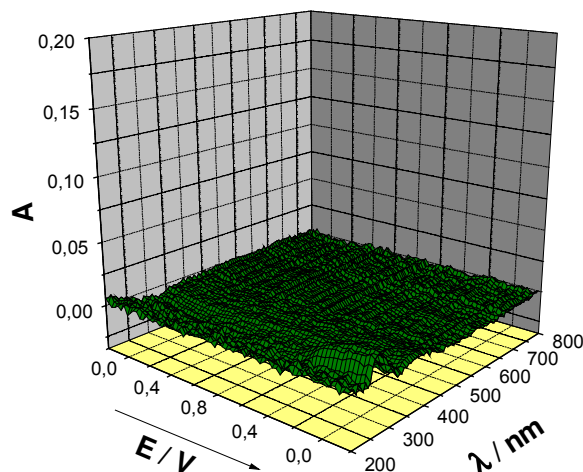


Figura 4.58 – Espectros do Ce(IV) na presença de EDTA durante a varredura de potencial. Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_i : -0,20 V, E_{inv} : 0,80 V, E_f : -0,20 V, v : 2 mV s^{-1} .

Todos os estudos SEC foram realizados na presença de compostos carboxílicos (**Figura 4.59**), uma vez que sem o carboxilato em solução o íon metálico hidrolisa em pH neutro e alcalino. Para avaliar o processo foram selecionados os espectros UV-Vis no potencial de +0,8 V, potencial esse que garante a oxidação da DA na superfície do eletrodo. Os espectros obtidos para a DA na presença de citrato, EDTA, Ce(IV) + citrato e Ce(IV) + EDTA estão apresentados na **Figura 4.59**. A partir dos espectros é possível verificar que a DA apresenta comportamento semelhante na presença de EDTA e Ce(IV) + EDTA. No entanto, na presença de Ce(IV) + citrato, verifica-se uma redução da intensidade da absorbância em todos os comprimentos de onda, o que indica que a DA foi consumida e que o citrato não estabilizou os produtos intermediários, ou seja, houve a formação de produtos poliméricos insolúveis em solução.

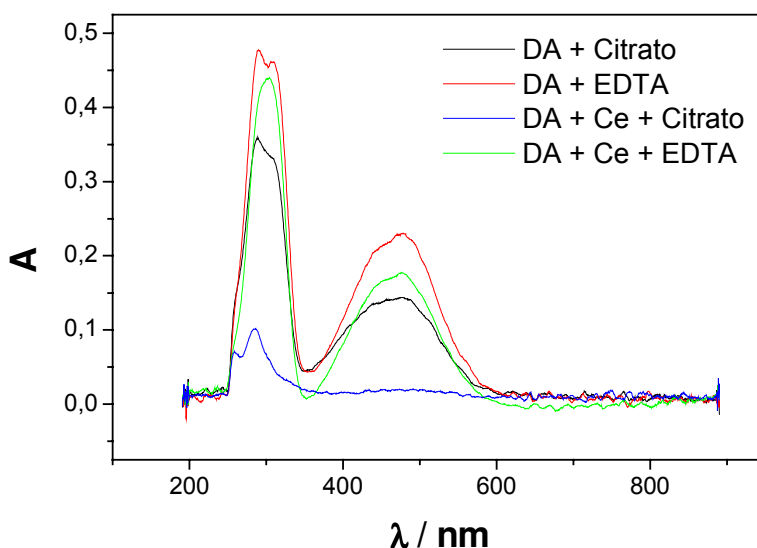


Figura 4.59 - Espectros UV/Vis registrados durante a aplicação do E_{inv} para a DA na presença de: (—) Citrato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$; (—) EDTA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$; (—) Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,010 \text{ mol L}^{-1}$; (—) Ce(IV) $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + Citrato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 8,0, E_{inv} : 0,80 V, v : 2 mV s^{-1} .

Estes resultados confirmam os obtidos por espectrofotometria UV-Vis, onde foi possível verificar que o EDTA diminui a velocidade de oxidação da DA pelos íons metálicos. Aqui fica evidenciado que o EDTA apresenta uma maior interação com os produtos de oxidação da DA quando comparado ao citrato.

4. Propostas de mecanismos da influência de compostos carboxílicos no comportamento redox de diferentes aminas biogênicas

Vários são os mecanismos envolvidos nos estudos realizados ao longo desse trabalho. Verificamos que o comportamento de algumas aminas biogênicas

é alterado com a adição de compostos carboxílicos e íons metálicos ao meio, indicando a alteração dos mecanismos clássicos já conhecidos. Para facilitar a compreensão, os mecanismos propostos estarão divididos em três itens: i) mecanismos de oxidação das diferentes aminas biogênicas, ii) interação dos produtos de oxidação das aminas biogênicas com compostos carboxílicos e iii) influência de íons metálicos na oxidação das aminas biogênicas na presença de compostos carboxílicos.

Para fins de caracterização do processo redox é apresentado um voltamograma característico da DA na ausência e presença de EDTA no eletrodo de platina (**Figura 4.60**). Os picos IA e IB referem-se as correntes anódicas oriundas da oxidação da DA na ausência de EDTA e os picos correspondentes IA' e IB' as correntes catódicas na varredura inversa. Como na presença de EDTA apenas aparece um pico anódico e outro catódico, esses serão denominados de IAB e IAB'. Essa terminologia será adotada para as demais aminas biogênicas.

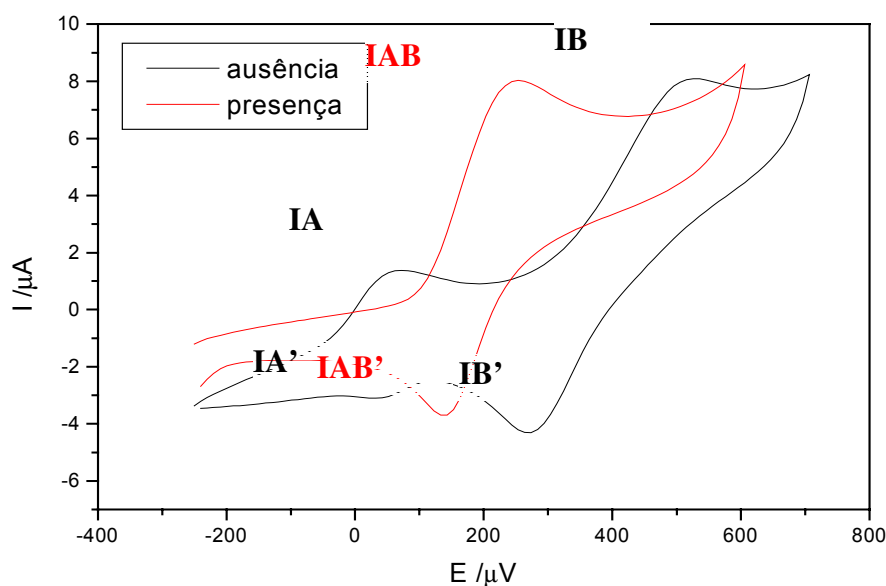


Figura 4.60 - Voltamograma cíclico da dopamina na ausência e presença de EDTA; Dopamina $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, 20 v, pH 7,0.

4.1. Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para dopamina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa na ausência de compostos carboxílicos

Compilando todos os resultados obtidos sugere-se que o processo redox para a DA, EP, L-dopa e NEP, cujas estruturas estão apresentadas na **Figura 4.61**, seguem o mesmo mecanismo eletroquímico. A proposta de mecanismo está esquematizada na **Figura 4.62**.

As aminas biogênicas que possuem um grupo catecol e uma amina primária no radical etilenoamino sofrem oxidação em duas etapas no eletrodo de Pt originando dois picos anódicos (IA e IB) e dois picos catódicos (IA' e IB') no voltamograma. O primeiro pico anódico ($E_{pa} \sim 0,1$ V) envolve a transferência de um elétron e um próton formando uma semiaminoquinona radical (SAQ \cdot). Por sua vez, em potencial mais positivo a SAQ \cdot sofre oxidação subsequente, mediante transferência de um elétron e um próton formando uma aminoquinona (AQ).

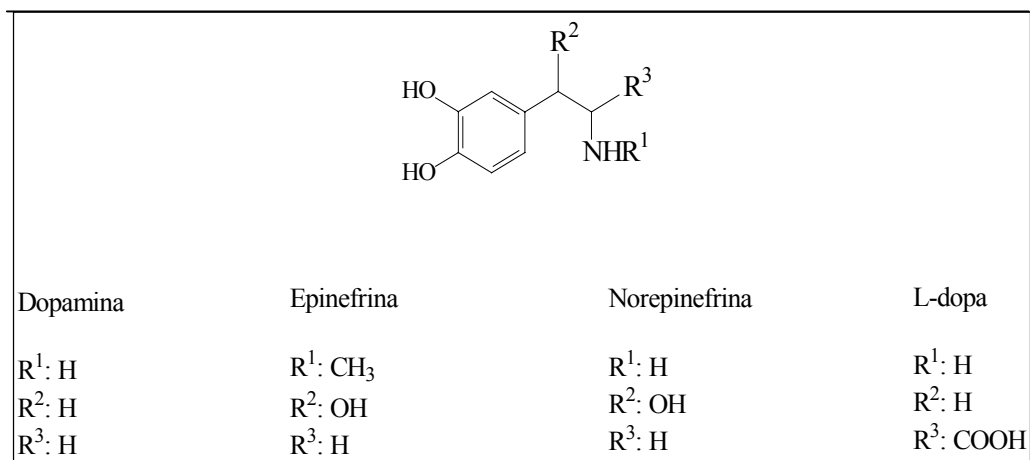


Figura 4.61 - Estrutura geral para as aminas biogênicas: DA, epinefrina, NEP e L-dopa.

A AQ, independentemente do pH do meio (3 a 9), sofre uma reação de ciclização intramolecular, que ocorre por um ataque nucleofílico sobre o anel

quinônico deficiente de elétrons pelo grupo amino da cadeia ao lado (adição de Michael 1,4), formando o correspondente composto leucoaminocromo (LAC) que pode existir em duas formas tautoméricas (LAC2 e LAC1). Os compostos LAC2 e LAC1 apresentam máximos de absorbância em 314 e 265, respectivamente. A subsequente oxidação do LAC ocorre de forma espontânea e leva a formação do aminocromo (AC) que possui um máximo de absorbância em 380 nm. Esse composto é instável e leva finalmente a formação de compostos poliméricos de baixa solubilidade e que são responsáveis pela passivação da superfície eletródica.

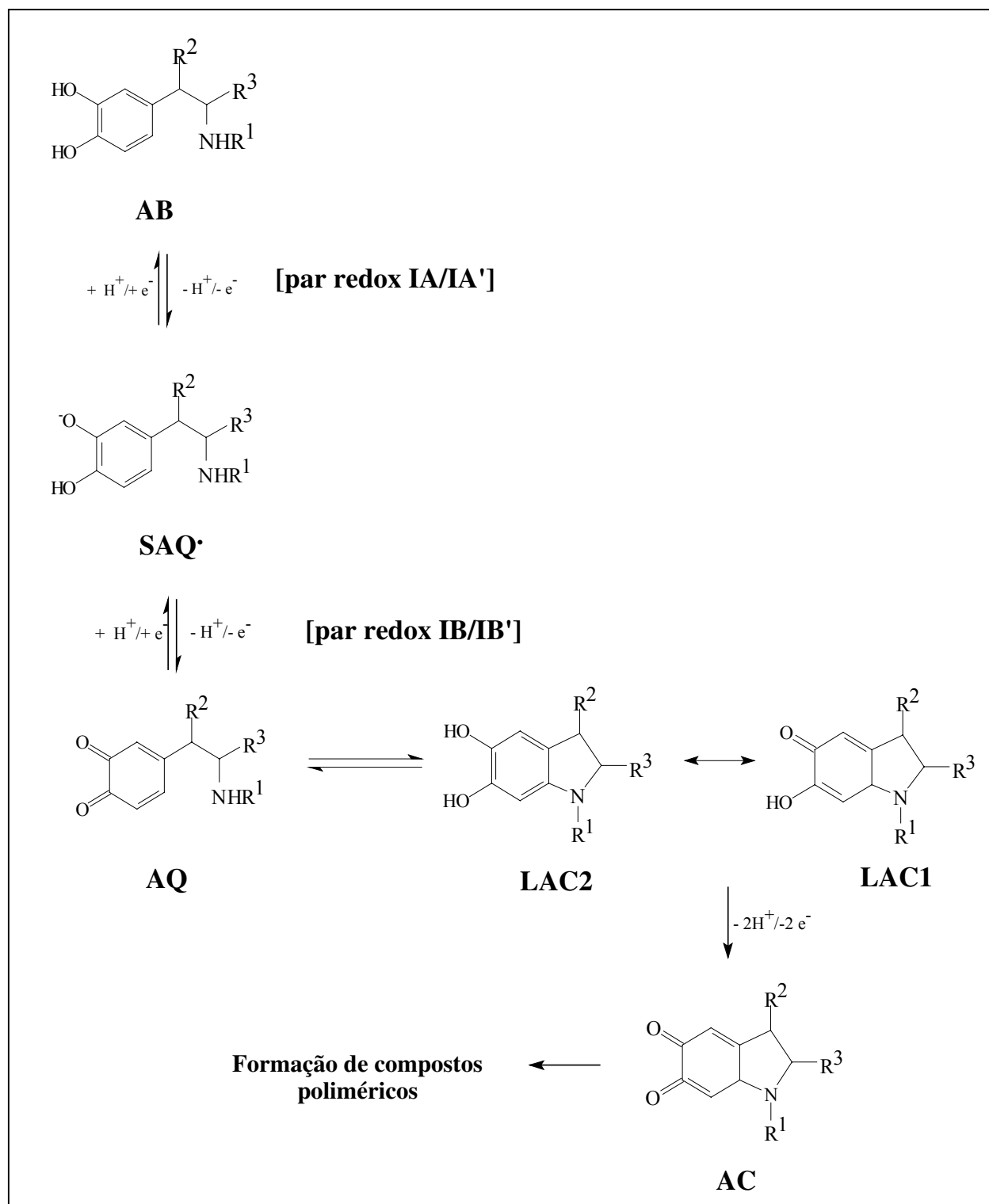


Figura 4.62 - Mecanismo geral para a oxidação de diferentes aminas biogênicas (DA, EP, NEP e L-dopa). [baseado em Hawley, et al., 1967]

4.2. Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para dopamina, epinefrina, norepinefrina e L-dopa na presença de compostos carboxílicos

A interação entre os compostos carboxílicos e os produtos de oxidação de algumas amins biogênicas tem como um dos fatores principais o pH do meio em que a reação ocorre. Este fator está vinculado ao pKa dos ácidos carboxílicos. Entre os carboxilatos avaliados (EDTA, EGTA, DTPA, NTA, acetato, oxalato e citrato) foi verificado que o EDTA e o citrato apresentaram maior interação com os produtos de oxidação das amins biogênicas. Os equilíbrios ácido-base do EDTA e citrato estão apresentados na **Figura 4.63**.

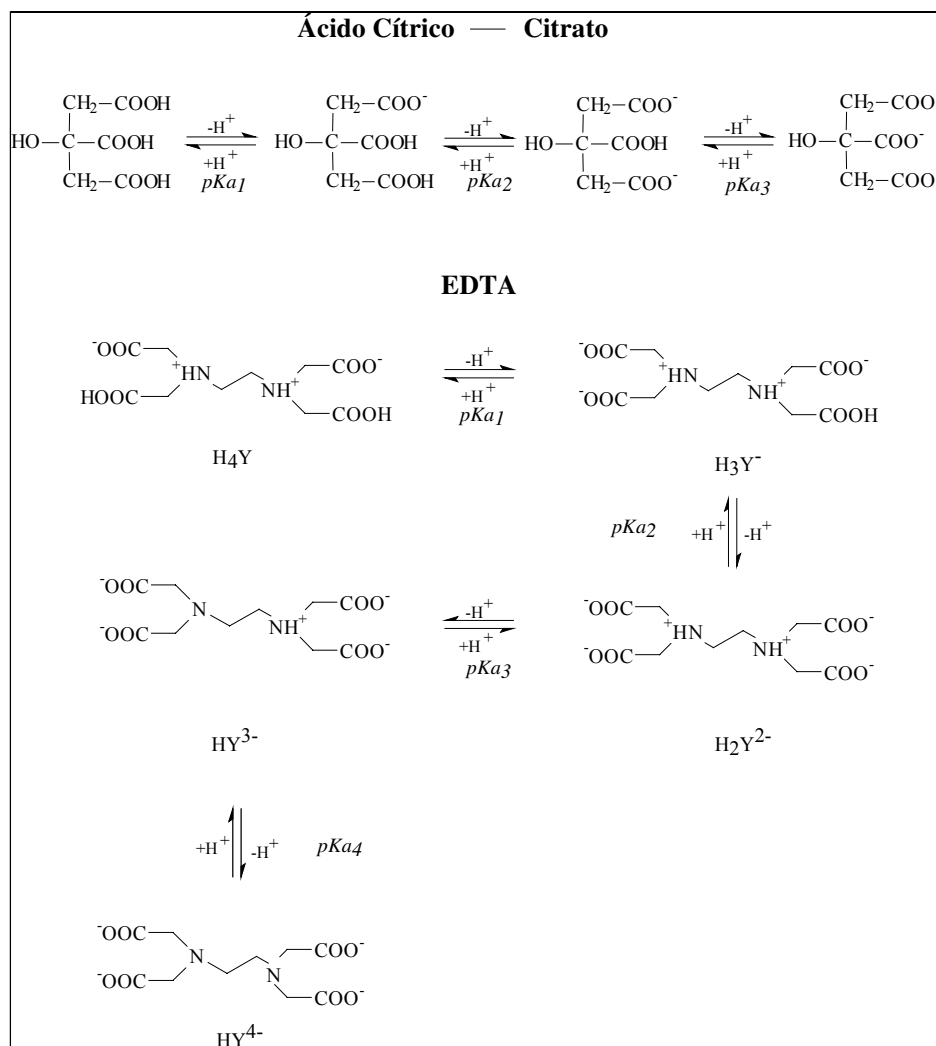


Figura 4.63 - Equilíbrio ácido-base para o ácido cítrico e EDTA.

Os compostos carboxílicos desprotonados interagem com os produtos de oxidação das aminas biogênicas por meio de ligações de hidrogênio, o que foi comprovado através dos estudos SEC e da simulação de espectros eletrônicos teóricos. Ainda, a interação dos produtos de oxidação das aminas biogênicas com os carboxilatos, com exceção da EP, inibe o processo de passivação dos eletrodos sólidos, uma vez que a formação de polímeros durante o processo de varredura de potencial é retardada. O comportamento da EP não somente é diferenciado no processo eletroquímico no eletrodo de Pt, mas também no eletrodo de mercúrio, no qual não foi observada a formação de uma nova espécie eletroativa quando oxidada na presença de citrato. Este resultado indica que se ocorre interação dos produtos de oxidação da EP com algum composto carboxílico avaliado, o produto dessa interação não é estável na escala de tempo da voltametria ou o mesmo não apresenta eletroatividade na janela de potencial avaliada. A diferença principal da EP com as demais aminas biogênicas é que a EP possui uma amina secundária em sua estrutura, enquanto as demais são aminas primárias. No processo eletroquímico após a formação da aminoquinona ocorre a ciclização da molécula formando o leucoaminocromo. Após ciclização, a EP não possui mais um átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio. Esses resultados indicam que existe uma ligação de hidrogênio do grupo amino com a molécula do carboxilato. As interações que se propõe, fundamentados nos resultados obtidos, estão apresentados na **Figura 4.64**.

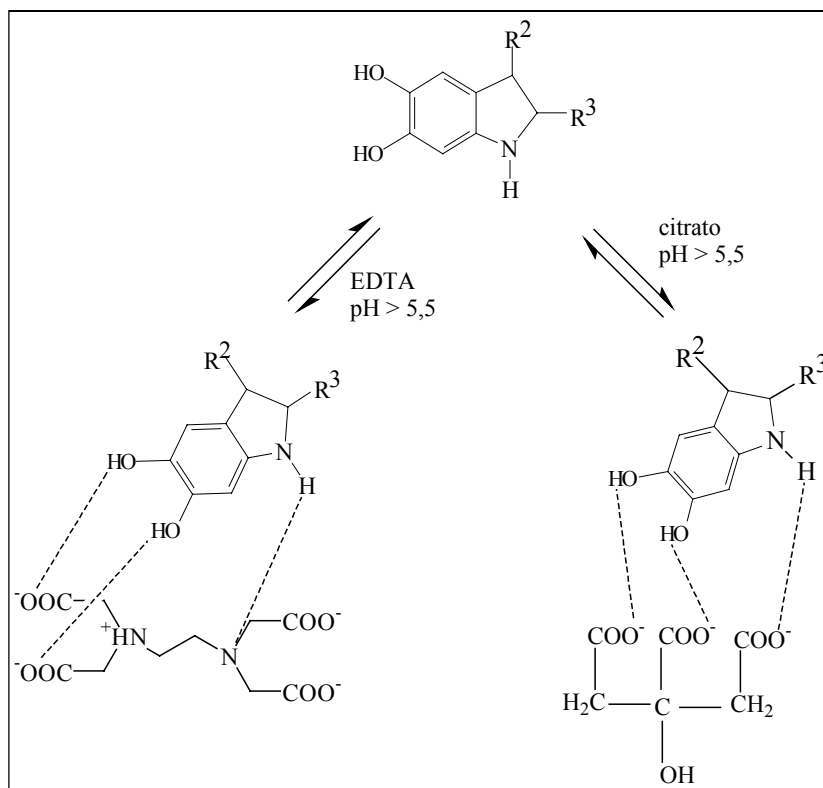


Figura 4.64 - Proposta de interação entre o produto de oxidação da DA ($R^1:H$, $R^2:H$ e $R^3:H$), NEP ($R^1:H$, $R^2:OH$ e $R^3:H$) e L-dopa ($R^1:H$, $R^2:H$ e $R^3:COOH$) com citrato e EDTA.

A proposta de mecanismo de oxidação da DA, NEP e L-dopa na presença dos carboxilatos (EDTA) está apresentada na **Figura 4.65**.

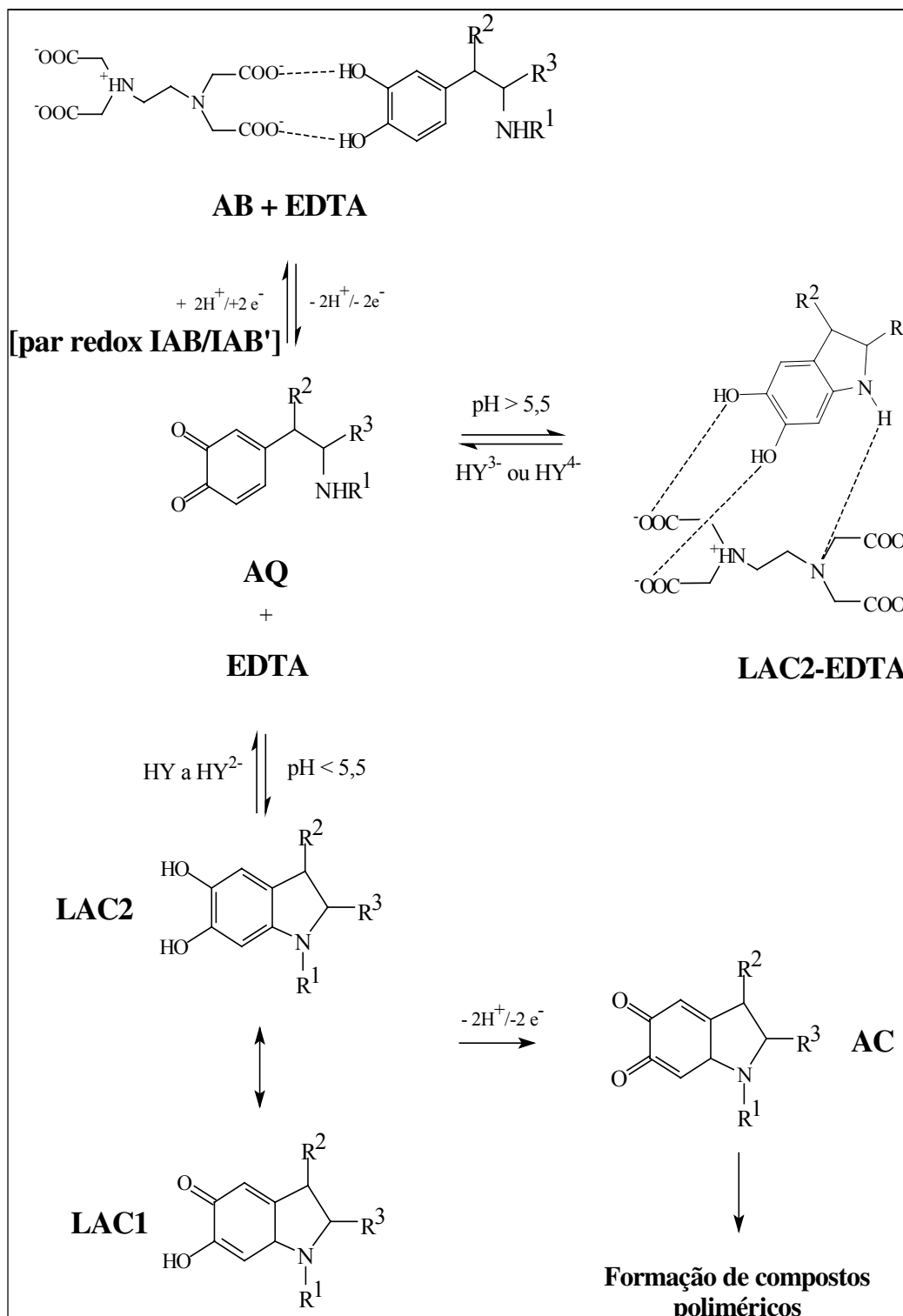


Figura 4.65 - Mecanismo de oxidação modelo para DA, norepinefrina e L-dopa na presença de EDTA

As aminas biogênicas (AB) que possuem um grupo catecol e uma amina primária no radical etilenoamino na presença de EDTA, citrato e acetato sofrem oxidação em uma única etapa no eletrodo de Pt originando um pico anódico (IAB) e um pico catódico (IAB'), com potenciais intermediários entre os valores observados para os picos IA / IB e IA' / IB' das aminas biogênicas na ausência do composto carboxílico no meio. Para os demais carboxilatos avaliados (EGTA, NTA, DTPA e oxalato) a oxidação ocorre em duas etapas, no entanto o ΔE_p entre os picos catódicos e entre os anódicos diminui em relação aos ΔE_p na ausência dos carboxilatos. Esses resultados indicam que o carboxilato interage com as aminas biogênicas anterior o processo de oxidação por intermédio de ligações de hidrogênio e, portanto, dificultam a primeira transferência de carga e remoção do próton da molécula para a formação do SAQ radical. A segunda transferência de carga é rápida e praticamente ocorre no mesmo potencial levando a formação da AQ. Devido a estrutura da AQ a interação com EDTA não é relevante. Em pH > 5,5 a AQ ciclizada (LAC) interage com o carboxilato desprotonado. O LAC pode existir em duas formas tautoméricas LAC2 e LAC1. A partir dos dados espectroeletroquímicos sugere-se que a espécie LAC2-carboxilato, que absorve em 480 nm, é mais estável do que a espécie LAC1. Em pH < 5,5, tendo em vista que o EDTA encontra-se preferencialmente na forma H_2Y^{2-} , a interação por intermédio de ligações de hidrogênio não é favorecida e a reação se procede como na ausência do carboxilato, levando a formação do aminocromo (AC). O AC por sua vez leva a formação de compostos poliméricos e é responsável pela passivação da superfície do eletrodo.

4.3. Mecanismo eletroquímico no eletrodo de Pt para serotonina na presença e ausência de carboxilatos

A ST por não pertencer ao grupo das catecolaminas apresenta um mecanismo eletroquímico diferenciado das demais aminas biogênicas (**Figura 4.66**). O mecanismo apresentado na **Figura 4.66** é baseado na literatura [Jackson,

et al., 1995; Sarada, *et al.*, 2000], sendo que os dados obtidos neste estudo confirmam esse mecanismo.

Quando a ST foi avaliada por voltametria na presença de citrato utilizando HMDE, foi verificado que o citrato não alterou o comportamento eletroquímico da ST e a nova espécie eletroativa que sofre redução em potenciais menores do que o produto de oxidação da amina biogênica não foi formado. No entanto, nos estudos espectroeletroquímicos utilizando eletrodo de platina foi observado que o comportamento da ST é alterado pela presença de citrato ou EDTA no meio.

Segundo mecanismo proposto na literatura, a ST sofre uma primeira oxidação perdendo dois prótons e 2 elétrons em aproximadamente 0,4 V. Este primeiro produto de oxidação, quando se encontra em meio aquoso, reage com uma molécula de água formando uma catecolamina. A catecolamina formada pode ser oxidada, sendo que a transferência de elétrons ocorre em potencial menor do que a primeira oxidação (aproximadamente -0,2 V), levando a formação de uma quinona. No caso como o potencial no final da varredura é maior do que -0,2 V, essa reação é espontânea.

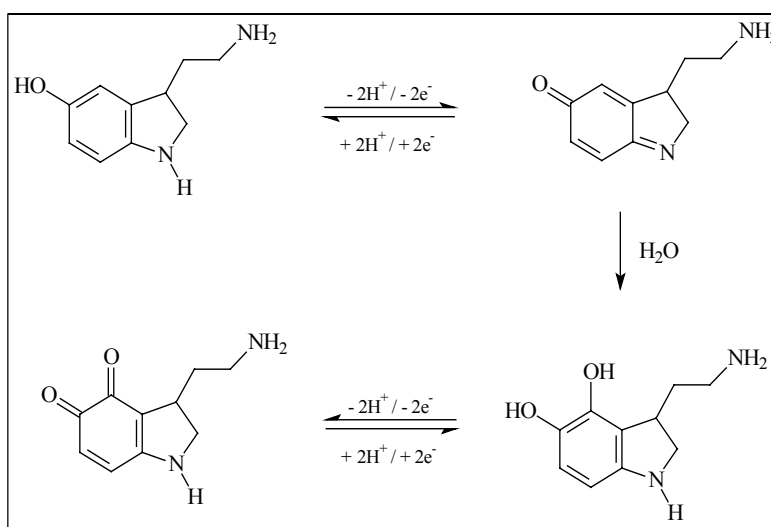


Figura 4.66 - Mecanismo de oxidação da serotonina [Jackson, *et al.*, 1995; Sarada, *et al.*, 2000].

A molécula apresentando um grupo catecol possibilita a interação com os compostos carboxílicos desprotonados, motivo pelo qual ocorre a mudança no comportamento redox da ST na presença do carboxilato. A proposta de mecanismo para a oxidação da ST na presença de EDTA está apresentada na **Figura 4.67**.

O EDTA não é capaz de evitar a passivação da superfície do eletrodo como observado para as outras aminas biogênicas, ou seja, o produto intermediário catecol oriundo da oxidação da ST com EDTA não é tão estável como os demais compostos avaliados.

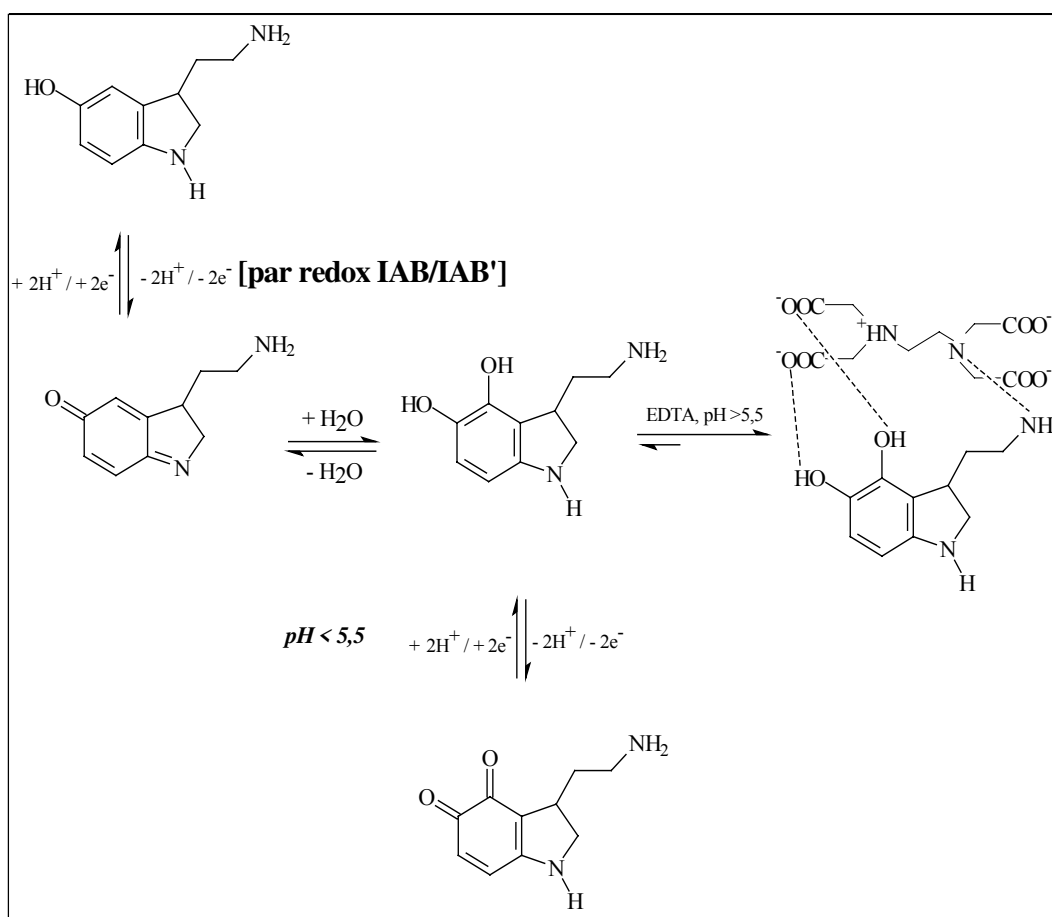


Figura 4.67 - Mecanismo de oxidação da ST na presença de EDTA.

4.4. Oxidação química de aminas biogênicas por metais de transição na presença de citrato ou EDTA

Com o intuito de avaliar o processo de oxidação química da DA por metais de transição na presença de carboxilatos, avaliando a cinética da reação, foram realizados diversos estudos mediante o emprego da espectrofotometria. Estes estudos foram realizados na presença de EDTA ou de citrato, os dois carboxilatos que apresentaram os maiores efeitos de interação com o processo redox da DA no eletrodo de mercúrio e de platina. Vários foram os metais avaliados nesses estudos, mas durante a realização dos experimentos, foi verificado que somente o Fe(III), Hg(II) e o Ce(IV) levaram a alterações no processo de oxidação da DA. Os demais metais que foram previamente avaliados (Mn(II), Cu(II), Zn(II) e Al(III)) não introduziram variações nos espectros ou no comportamento eletroquímico da DA. Apesar desses metais não alterarem o comportamento redox da DA durante a varredura de potencial, alterações relacionadas a eles são atribuídos como uma das causas do aparecimento de doenças neurodegenerativas. Como esses metais não atuam diretamente no mecanismo redox da DA, sugere-se que estes devem interferir na recapturação dos neurotransmissores na fenda sináptica ou na síntese bioquímica.

Quando o Fe(III), Hg(II) e o Ce(IV) foram avaliados foi verificado que estes provocam um aumento na velocidade de oxidação da DA, atuando como agentes oxidantes devido ao seu alto potencial de redução. Ainda foi verificado que a DA na presença de Fe(III) apresenta um comportamento diferente quando comparado ao Ce(IV) e ao Hg(II), onde o complexo Fe(III) – DA ou seu produto de oxidação apresenta no espectro UV-Vis máximos de absorbância em comprimentos de onda maiores do que os demais compostos e os produtos da reação são mais estáveis. O mecanismo de oxidação da DA na presença de Fe(III) já encontra-se descrito em literatura, os dados obtidos neste trabalho confirmam os mesmos (**Figura 4.68**).

Segundo mecanismo proposto, o complexo formado entre ferro e DA é responsável pelo desenvolvimento da coloração esverdeada apresentada pela mistura com máximo de absorbância em 580 nm [Winter, 2003].

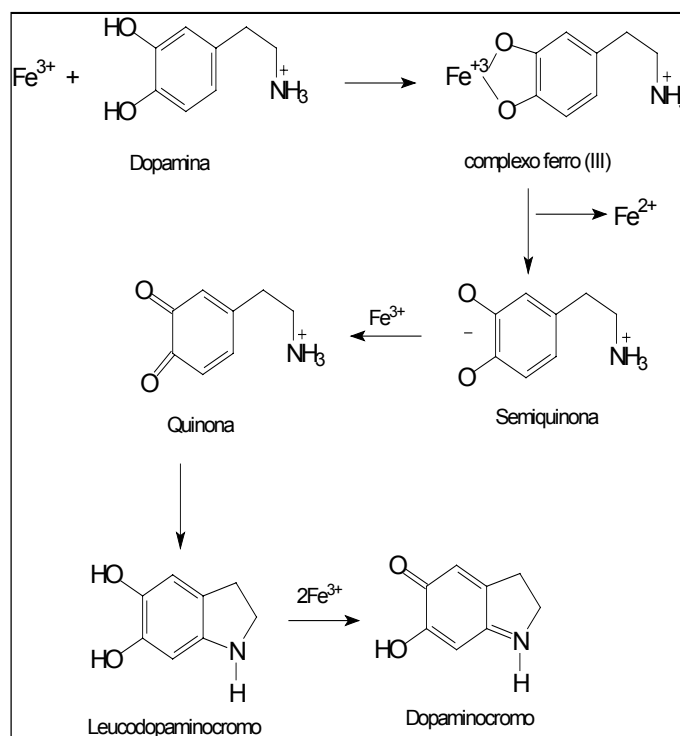


Figura 4.68 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Fe(III) e ausência de carboxilatos [El-Ayaan, *et al.*, 1997].

O Fe(III) oxida a DA levando a formação de uma semiquinona e quinona, produtos idênticos aos propostos na oxidação eletroquímica. No entanto, na presença de EDTA ou citrato a reação é mais lenta, indicando novamente que os compostos carboxílicos estabilizam os produtos intermediários, provavelmente aqueles que apresentam um catecol na sua estrutura. Ainda, na presença do carboxilato quelante é necessário considerar que o EDTA e citrato complexam tanto com o Fe(III) como a catecolamina em solução.

Após avaliar a influência do Fe(III) na oxidação da DA, foram avaliados o Hg(II) e o Ce(IV), esses metais, na presença de compostos carboxílicos apresentam compostos formados com as mesmas bandas observadas nos estudos espectroeletroquímicos. Quando foram comparados os comprimentos de

onda de máxima absorção observados nos estudos espectrofotométricos e espectroeletroquímicos, na presença e ausência de metais de transição e compostos carboxílicos foi verificado que os produtos de oxidação apresentados na presença de metais de transição apresentam máximos de absorbância em comprimentos de ondas iguais aos apresentados para os estudos realizados na ausência dos íons metálicos. No entanto, foi verificado que a velocidade da reação de oxidação é diferente. A cinética da reação para a oxidação da DA na presença dos íons metálicos e de citrato é maior do que a cinética apresentada na presença de íons metálicos e EDTA. Esses resultados confirmam o que foi observado no estudo de degradação da DA em eletrodos sólidos e indica que o mecanismo em si não é alterado, simplesmente a velocidade da reação é aparentemente maior. Seqüencialmente serão apresentados os mecanismos envolvidos da oxidação da DA na presença de citrato e EDTA para o Hg(II) (**Figura 4.69**) e para o Ce(IV) (**Figura 4.70**).

O Hg(II) forma complexo estável com o citrato ou EDTA desprotonado (reação A) e portanto essa reação depende do pH do meio. O complexo formado reage com a dopamina levando a formação de dopaminoquinona (DQ). Essa por sua vez pode sofrer ciclização formando o leucodampinocromo (LDC) que é estabilizado pelo carboxilato. O LDC pode ser novamente oxidado por duas outras moléculas de HgCit^- ou de HgHY^- levando a formação de dopaminocromo, que é o precursor da formação de compostos poliméricos.

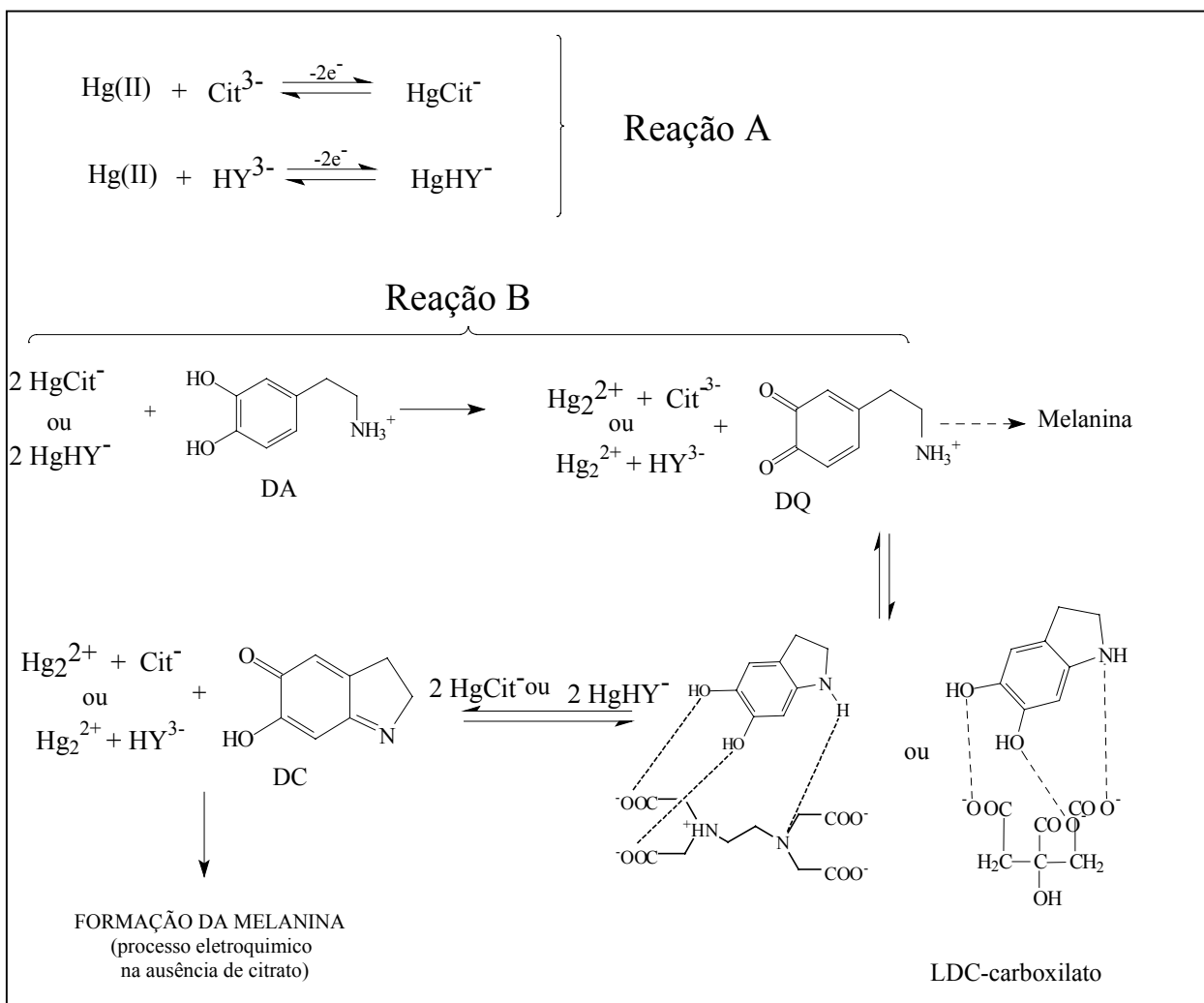


Figura 4.69 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Hg(II) e de citrato ou EDTA.

A reação de oxidação da DA na presença de Ce(IV) segue rota similar ao verificado para o Hg(II), com a diferença de que o Ce(IV) não forma complexo com o carboxilato. A proposta de mecanismo está apresentada na **Figura 4.70**.

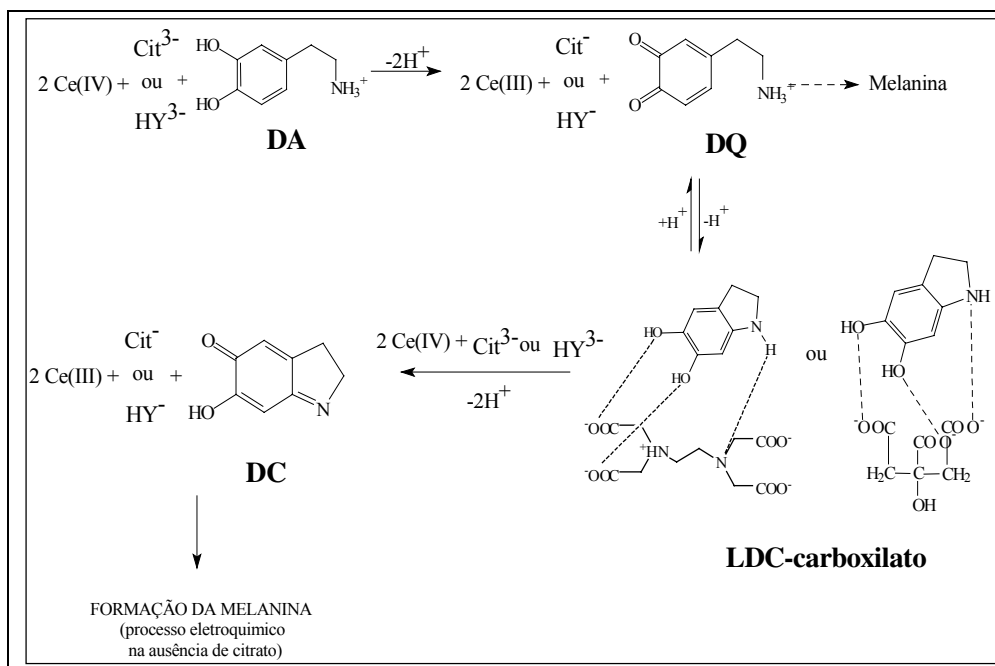


Figura 4.70 - Mecanismo de oxidação da DA na presença de Ce(IV) na presença de citrato e EDTA.

Avaliando os resultados anteriormente obtidos para o Hg(II) e o Ce(IV), verificamos que na presença de EDTA a oxidação da DA é mais lenta quando comparada à oxidação na presença de citrato, indicando que o complexo EDTA: leucodopaminocromo é mais estável do que o complexo formado com citrato.

V. Conclusões

CONCLUSÕES

Como conclusões de todos os estudos realizados temos a destacar:

- A oxidação eletroquímica das diferentes catecolaminas segue o mesmo mecanismo. A transferência de um elétron e um próton leva na primeira etapa a formação de uma semiaminoquinona radical. Esse composto radical perde um elétron e um próton originando uma aminoquinona que por uma reação de ciclização intramolecular forma um composto leucoaminocromo. Esse composto facilmente é oxidado levando a formação do aminocromo, o qual é instável e leva a formação de compostos poliméricos que são responsáveis pela passivação dos eletrodos sólidos.
- Compostos carboxílicos adicionados ao meio interagem com produtos de oxidação das aminas biogênicas, em particular o leucoaminocromo, que apresenta um catecol em sua estrutura estabilizando esse intermediário e dificultando a oxidação para o aminocromo e subsequente formação de compostos poliméricos. Sendo assim, os compostos carboxílicos tendem a inibir fenômenos de passivação dos eletrodos sólidos, o que é importante do ponto de vista do desenvolvimento de métodos analíticos.
- A estrutura do carboxilato é determinante para que ocorra a interação entre o produto de oxidação da amina biogênica e o carboxilato. Carboxilatos quelantes que apresentam átomo de N em sua estrutura interagem de forma mais eficiente, destacando-se, em particular, o EDTA. As interações podem ser explicadas teoricamente, mediante modelagem molecular. Ainda, para que ocorra a interação é necessário que o carboxilato tenha no mínimo três sítios disponíveis para ligações de hidrogênio. Preferencialmente, as interações ocorrem entre o produto de oxidação da amina biogênica com dois carboxilatos e um átomo de nitrogênio.
- Em relação a amina biogênica, para que ocorra a interação com o carboxilato é necessário que a amina biogênica apresente um catecol e um grupo etilenoamino na sua estrutura. Produtos de oxidação de aminas

secundárias após sofrerem reação de ciclização não possuem mais um hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio o que impede a ligação de hidrogênio com o carboxilato.

- Estudos eletroquímicos utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) demonstraram que para que ocorra a formação de uma nova espécie eletroativa em potenciais mais negativos comparado à oxidação das aminas biogênicas, estas devem apresentar um grupo catecol e uma amina primária no radical etilenoamino. Além disso, para que esta mesma espécie eletroativa se forme é necessário a adição de um carboxilato que apresente estrutura apropriada de modo a não provocar impedimento estérico na formação da espécie e apresente pelo menos três carboxilas desprotonadas para que possa ocorrer a interação;
- O intermediário eletroativo formado durante a oxidação da dopamina no eletrodo de mercúrio é proporcional à concentração da dopamina e, pode, portanto ser empregada para fins quantitativos da amina biogênica. Um método para a determinação de dopamina usando eletrodo de mercúrio foi desenvolvido [Winter, *et al.*, 2007].
- A espectroeletroquímica se mostrou uma ferramenta muito importante para o estudo do mecanismo, pois possibilitou uma avaliação *in-situ* das espécies intermediárias, esclarecendo as etapas de oxidação e como ocorrem as interações com os compostos carboxílicos;
- A presença de metais com alto potencial de redução promovem a oxidação das aminas biogênicas, mas este processo pode ser retardado ou evitado com a adição de compostos carboxílicos ao meio, especialmente EDTA;
- Dos compostos carboxílicos avaliados, o EDTA, devido a sua estrutura e equilíbrio hidrogeniônico, é o composto carboxílico que melhor interage com os compostos de oxidação das aminas biogênicas. A interação do EDTA com a dopamina pode ser importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas.

VI. Perspectivas Futuras

PERSPECTIVAS FUTURAS

Por meio destes estudos, duas linhas de pesquisas podem ser desenvolvidas:

- Desenvolvimento de métodos analíticos utilizando EDTA e outros compostos carboxílicos como eletrólito ou em eletrodos modificados para a determinação e estudo de compostos fenólicos;
- Aplicação das informações das estruturas dos compostos carboxílicos obtidos neste trabalho, visando o desenvolvimento, por meio de sínteses orgânicas, de novos compostos com características específicas de evitar a degradação de neurotransmissores, podendo assim ser administrados juntamente com os medicamentos hoje existentes para o tratamento de doenças neurodegenerativas, potencializando este tratamento.

VII. Referências

Referências

- Aklirezaei M.; Nairn, A.C.; Glowinski, J.; Premont J. e Marin P, *J. Biol. Chem.* **1999**, v. 274, p. 32433.
- Álvarez, E. M.; Otero, R. S.; Ameijeiras, A. H.; Martín, M. E. L.; García, J. L. L.; *Free Rad. Bio. & Med.*, **2001**, v. 31, p. 986.
- Assaf, S.Y. e Chung, S.H., *Nature* **1984**, v. 308, p. 734.
- Babaei, A.; McQuillan, A. J.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, v. 441, p. 43.
- Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and applications*, J. Wiley & Sons, New York, 2ed. **2001**.
- Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Eletroanal. Chem.*, v.10, A. J. Bard, Marcel Dekker, New York, **1997**.
- Borrás, C. A.; Romagnoli, R.; Lezna, R. O.; *Electrochimica Acta*, **2000**, v. 45, p. 1717.
- Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Eletroquímica, Principios, Métodos e Aplicações*, Oxford University Press; Oxford, **1993**.
- Büschel, M.; Stadler, C.; Lambert, C.; Beck, M.; Daub, J.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, v. 484, p. 24.
- Calbreath, D. F.; *Clinical chemistry: a fundamental textbook*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, **1992**.
- Carlsson, A.; Hansson, L. O.; Waters, N.; Carlsson, M.L.; *Life Sci.* **1997**, v. 61, p. 75.
- Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rath, S.; *J. Electroanal. Chem*, **2003**, v. 548, p. 19.
- Cohen, G. D.; *O cérebro no envelhecimento humano*. Organizações Audrei, São Paulo, **1995**.
- Connor, J.R. e Benkovic, S. A., *Ann. Neurol.* **1992**, v. 32, p. S52.
- Connor, J.R., Snyder, B. S., Arosio, P., Loeffler, D.A. e LeWitt, P.A., *J. Neurochem.* **1995**, v. 65, p. 717.
- Cuajungco, M.P.; Lees E. G.J., *Neurobiol. Dis.* **1997**, v. 4, p. 137.
- Cui, H.; Wu, L.; Chen, J. Lin, X.; *J. Electroanal. Chem*, **2001**, v. 504, p. 195.

Daniel, D.; *Desenvolvimento de célula espectroeletroquímica em fluxo e sua aplicação analítica ap estudo e a determinação de derivados fenotiazínicos*, Tese de doutorado, **2004**, USP, São Paulo, SP.

DeAngelis, T. P.; Heineman, W. R.; *J. Chem. Educ.*, **1976**, v. 53, p. 594.

deUngria, M.; Rao, R.; Wobken, J. D.; Luciana, M.; Nelson, C.A. e Georgieff, M. K., *Pediatric Res.* **2000**, v. 48 , p. 169.

DiDonato, M.; Sarkar, B., *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, v. 1360, p. 3.

Dong, S. J.; Zhu, Y. C.; Cheng, G. J.; *Langmuir*, **1991**, v. 7, p. 2253.

Dryhurst G.; Kadish K. M.; Scheller F.; Renneberg R.; *Biological Electrochemistry* Vol. 1, Academic Press, New York, **1982**.

El-Ayaan, U.; Herlinger, E.; Jameson, R. F. e Linert, W., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, v. 16, p. 2813.

Evans, J. F.; Blount, H. N.; Ginnard, C. R.; *J. Electroanal. Chem.*, **1975**, v. 59, p. 169.

Faro, L. R. F.; Nascimento, J. L. M.; Alfonso, M.; Duran, R.; *Ecotox. Environ. Saf.*, **2001**, v. 48, p. 263.

Felt, B.I; TeLosoff, B., *J. Nutrition* **1996**, v. 126, p. 693.

Flowers, P. A.; Maynor, M. A.; Owens, D. E.; *Anal. Chem.*, **2002**, v. 74, p. 720.

Fotopoulou, M. A.; Ioannou, P. C.; *Anal. Chim. Acta*, **2002**, v. 462, p. 179.

Frederickson, C.J. *Int. Rev. Neurobiology*, **1989**, v. 31, p. 145.

Frederickson, C.J.; Hernandez, M. D. e McCinty, J.F., *Brain Res.* **1989**, v. 480, p. 317.

Gerard, C.; Ghehhal, H., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1997**, v. 134, p. 1069.

Gidanian, S.; Farmer, P. J.; *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, v. 89, p. 54.

Gorell, J.M.; Ordidge, R.J.; Brown, G.G.; Deniau, J.-C.; Buderer, N.M.; Helpern, J. A., *Neurology* **1995**, v. 45, p. 1138.

Grossman, M.; Glosser, G.; Kalmanson, J.; Morris, J.; Stern, M.B.; Hurtig, H.I.; *J. Neurol. Sci.* **2001**, v. 184, p. 123.

Gueutin, C.; Lexa, D.; *Electroanal.*, **1996**, v. 11, p. 1029.

Guyton, A. C., *Tratado de fisiologia médica*, 6 ed. Guanabara, Rio de Janeiro, **1986**.

Hawley M. D.; Tatawawa S. V.; Piekarsk S., Adams R. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, v. 89, p. 447

89, p. 447.

Heering, H. A.; Hagen, W. R.; *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, v. 364, p. 235.

Heineman, W. R.; *Anal. Chem.* **1978**, v. 50, p. 390A.

Heineman, W. R.; Goelz, J. F.; *J. Electroanal. Chem.*, **1978**, v. 89, p. 437.

Heineman, W. R.; Hawkridge, F. M.; Blount, H. N.; Bard, A. J.; *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 13, Marcel Dekker, New York, **1984**.

Heineman, W. R.; Kuwana, T.; *Anal. Chem.*, **1971**, v. 43, p. 1069.

Holze, R.; *Electrochem. Acta*, **1993**, v. 38, p. 947.

Holze, R.; Malinauskas, A.; *Electrochimica Acta*, **1999**, v. 44, p. 2613.

<http://www.umc.br/~ferga/utills/> , acessado em 15/04/2007.

Jackson, B. P.; Dietz, S. M.; Wightman, R. M.; *Anal Chem*, **1995**, v. 67, p. 1115.

Jeanmaire, D. L.; Suchanski, M. R.; Van Duyne, R. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, v. 97, p. 1899.

Jewett, S.L.; Egging, S. e Geller, L., *J. Inorg. Biochem.* **1997**, v. 66, p. 165.

Kardash, D.; Huang, J.; Korzeniewski, C.; *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, v. 476, p. 95.

Kardos, J.; Kovacs, I.; Hajos, F.; Kalman, M. e Simonyi, M., *Neurosci. Lett.* **1989**, v. 103, p. 139.

Kim, S. H.; Lee, J. W.; Yeo, I. H.; *Electrochimica Acta*, **2000**, v. 45, p. 2889.

Kirchhoff, J. R.; Lee, Y. F.; *Anal. Chem.*, **1993**, v. 65, p. 3430.

Kirchhoff, J. R.; Lee, Y. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, v. 116, p. 3599.

Kiss, T. e Gergely, A., *Inorg. Chim. Acta* **1979**, v. 36, p. 31.

Koh, J.Y.; Suh, S.W.; Gwag, B.J., He, Y.Y.; Hsu, C.Y. e Choi, D.W., *Science* **1996**, v. 272, p. 1013.

Kuwana, T.; Darlington, R. K.; Leedy, D. W.; *Anal. Chem*, **1964**, v. 36, p. 2023.

Kuwana, T.; Heineman, W. R.; *Anal. Chem.* **1976**, v. 9, p. 241.

Lee, J.Y.; Cole, T.B.; Palmiter, R.D.; Koh, J.Y., *J. Neurosci* **2000**, v. 20, p. RC79-U8.

Leung, P. Y.; Tsao, C. S.; *J. Chromatogr.*, **1992**, v. 576, p. 245.

- Linert, W.; Jameson, G. N. L.; *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, v. 79, p. 319.
- Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G. Dong, S.; *Electroanalysis*, **2003**, v. 15, p. 103.
- Lobner, D.; Canzoneiro, L.M.T.; Manzerra P.; Gottron, F.; Ying, H.; Kunudson, M.; Tian, M.; Dugan, L.L.; Kerchner, G. A.; Sheline, C.T.; Korsmeyer, S. J. e Choi, D. W., *Cell. Mol. Biol.* **2000**, v. 46, p. 797.
- López-Palácios, J.; Colina, A.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L.; *Anal. Chem.*, **2001**, v. 73, p. 2883.
- López-Palácios, J.; Colina, A.; Heras, A.; Ruiz, V.; Seeber, R.; *Electrochem. Comm.*, **2002**, v. 4, p. 451.
- Ma, S.; Wu, Y.; Wang, Z, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, v. 464, p. 176
- Müller, J.; Kikuchi, A.; Bill, E.; Weyhermüller, T.; Hildebrandt, P.; Ould-Moussa, L.; Wieghardt, K.; *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, v. 297, p. 265.
- Nappi, A. J. e Vass, E., *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, v. 1425, p. 159.
- Nekrasov, A.; Ivanov, V. F.; Vannikov, A. V.; *J. Electroanal. Chem*, **2000**, v. 482, p. 11.
- Niu, J.; Dong, S. *Electrochimica Acta*, **1993**, v. 38, p. 257.
- Niu, J.; Dong, S.; *Electroanal.*, **1995**, v. 7, p. 1059.
- Owens, J. L.; Dryhurst, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1977**, v. 80, p. 171.
- Owens, J. L.; Marsh, Jr., H. A.; Dryhurst, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1978**, v. 91, p. 231.
- Petek, M.; Neal, T. E.; Murray, R. W.; *Anal. Chem*, **1971**, v. 43, p. 1069.
- Pinkerton, T. C.; Hajizadeh, K.; Deutsch, E.; Heineman, W. R.; *Anal. Chem.*, **1980**, v. 52, p. 1542.
- Powell, L. A.; Wightman, R. M.; *Anal. Chim. Acta*, **1997**, v. 342, p. 13.
- Prohaska, J. R.; Bailey, W. R., *J. Nutr.* **1993**, v. 123, p.1226.
- Prohaska, J. R.; Bailey, W. R., *Neurochem.* **1994**, v. 63, p. 1551.
- Pruiksma, R.; McCreery, R. L.; *Anal. Chem.*, **1979**, v. 51, p. 2253.
- Qian, Z.M.; Wang, Q. e Pu, Y.M, *Clin. Med. J.* **1997**, v. 110, p. 455.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; *Farmacologia*. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **1997**.

- Rao, R.; deUngría, M. e Sullivan D., *J. Nutr.* **1999**, v. 129, p. 199.
- Rein, F. N.; Rocha, R. C.; Toma, H. E.; *J. Inorg. Biochem.* **2001**, v. 85, p. 155.
- Robertis, A.; Stefano, C.; Foti, C.; Giuffrè, O.; Sammartano, S.; *Talanta*, **2001**, v. 54, p. 1135. (a)
- Robertis, A.; Stefano, C.; Foti, C.; Sammartano, S.; *J. Chem. Eng. Data*, **2001**, v. 46, p. 1365. (b)
- Robinson, G. M.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Electrochimica Acta*, **1998**, v. 43, p. 3489.
- Rubim, J. C.; Gutz, I. G. R.; Sala, O.; *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, v. 199, p. 55.
- Saito, T.; Okabe, M.; Hosakawa, T.; Kurasaki, M.; Hata, A.; Endo, F.; Matsuda, I.; Urakami, K-L. e SaitoK., *Neuroscience Lett*, **1999**, v. 266, p. 13.
- Sarada. B. V.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; *Anal. Chem.* **2000**, v. 72, p. 1632.
- Sayre, L. M.; Perry, G.; Atwood, C. S.; Smith, M. A.; *Cell. Mol. Biol.* **2000**, v. 46, p. 731.
- Scott, N. S.; Oyama, N.; Anson, F. C.; *J. Electroanal. Chem.*, **1980**, v. 110, p. 303.
- Silverstein, R. M.; Bassier, G. C.; Morrili, T. C.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 5ª. Edição, Guanabara, **1991**.
- Simmons, N. J.; Porter, M. D.; *Anal. Chem.*, **1997**, v. 69, p. 2866.
- Simone, M. J.; Heineman, W.R.; Kreishman, G. P.; *Anal. Chem.*, **1982**, v. 54, p. 2382.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition*, Saunders College Publishing, Orlando, **1998**.
- Sorrels, J. W.; DeWald, H. D.; *Electroanal.* **1992**, v. 4, p. 487.
- Spreitzer, H.; Scholz, M.; Gescheidt, G.; Daub, J. *Liebigs Annalen* **1996**, v. 12, p.2069.
- Stargardt, J. F.; Hawkridge, F. M.; Landrum, H. L.; *Anal. Chem.*, **1978**, v. 50, p. 930.
- Stefano, C.; Gianguzza, A.; Maniaci, R.; Piazzese, D.; Sammartano, S.; *Talanta*, **1998**, v. 46, p. 1079.
- Stotter, J.; Haymond, S.; Zak, J. K.; Show, Y.; Cvackova, Z.; Swain, G. M.; *Electrochem. Soc. Interface Spring*, **2003**, v. 12, p. 33.
- Stotter, J.; Zak, J. K.; Behler, Z.; Show, Y.; Swain, G. M.; *Anal. Chem.*, **2002**, v. 74, p. 5924.
- Strausak, D.; Mercer, J. F. B.; Dieter, H. H.; Stremmel, W.; Multhaup, G.; *Brain, Res.*

Bulletin, **2001**, v. 55, p. 175.

Sulzer D.; Pothos E. N.; *Rev. Neurosci.* **2000**, v. 11, p. 159.

Sun, H. R.; Zhang, S. Y.; Xu, J. Q.; Yang, G. Y.; Shi, T. S.; *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, v. 455, p. 57.

Tam, K. P.; Wang, R. L.; Lee, C. W.; Compton, R. G.; *Electroanal.*, **1997**, v. 9, p. 219.

Torimura, M.; Mochizuki, M.; Kano, K.; Ikeda, T.; Ueda, T.; *Anal. Chem.*; **1998**, v. 70, p. 4690.

Tumer, Z. e Horn, N., *J. Med. Genet.* **1997**, v. 34, p. 265.

Tyson, J. F.; West, T. S.; *Talanta*, **1978**, v. 26, p. 117.

Valle, L. B. S.; Oliveira Filho, R. M.; DeLucia, R.; Oga, S.; *Farmacologia integrada: fundamentos farmacológicos de terapêutica*. Rio de Janeiro : Atheneu, **1991**. v. 2. p.27.

van Rensburg, S.L.; Certens, M.E.; Potocnik, F.C.V.; van der Spuy, G.; van der Walt, B.J. e Taljaard, J.J.F., *Med. Hypotheis* **1995**, v. 44, p. 268.

Wang, J.; *Analytical Electrochemistry*, J. Wiley & Sons, New York, 2ed. **2000**.

Wang, J.; Walcarius, A.; *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, v. 407, p. 183.

Wang, Z.; Li, X.; Wu, Y, Tang, Y.; Ma, S.; *J. Electroanal. Chem.* **1999**, v. 464, p. 181.

Wang, Z.; Zhao, M.; Scherson, D. A.; *Anal. Chem.*, **1994**, v. 66, p. 4560.

Winter, E.; Codognoto, L. Rath, S.; *Anal. Letters*, **2007**, v.40, p. 1197.

Winter, E.; Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rath, S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, v. 14, p. 564.

Winter, E.; Codognoto, L.; Rath, S.; *Electrochimica Acta*, **2006**, v. 51, p. 1282.

Winter, E.; Estudo do comportamento eletroquímico de aminas biogênicas na presença de carboxilatos utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio, Dissertação de mestrado **2003**, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP.

Xie, Q.; Kuang, W.; Nie, L.; Yao, S.; *Anal. Chim. Acta*, **1993**, v. 276, p. 411.

Yang, G. J.; Xu, J. J.; Chen, H. Y.; *Chinese J. Chem.*, **2004**, v. 22, p. 1325.

Youdin, M. B. H., *Nutrition* **2000**, v. 16, p. 504.

Youdin, M. B. H.; Bem-shadrar, D.; Yehuda, S., *Am. J. Clin. Nutri.* **1989**, v. 50, p. 607.

Zak, J. K.; Butler, J. E.; Swain, G. N.; *Anal. Chem.*, **2001**, v. 73, p. 908.

Zak, J.; Porter, M. D.; Kuwana, T.; *Anal. Chem*, **1983**, v. 55, p. 2219.

Zanini, A. C.; Oga, S.; *Farmacologia aplicada*, 5 ed. Atheneu, São Paulo, **1994**, Cap. 21 e 26.

Zhang, J.; Jeon, C.; *Anal. Sci.*, **2002**, v. 18, p. 1085.

Zhu, Y.; Cheng, G.; Dong, S.; *Electroanalysis*, **1998**, v. 10, p. 955.