

OANA COJUHOVSKI

**COMPLEXOS DE PALÁDIO COM LIGANDOS
BIOLÓGICOS: ESTUDO ELECTROQUÍMICO DA
INTERACÇÃO COM ADN**

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

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

2008

*"An expert is a person who has made
all the mistakes that can be made
in a very narrow field."*

Niels Bohr

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett desejo expressar os meus sentidos agradecimentos pela oportunidade concedida de trabalhar no seu grupo de investigação, bem como pela orientação, apoio científico e a disponibilidade ao longo destes anos.

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

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

Agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, bolsa de doutoramento SFRH/BD/18914/2004 e ao Instituto Pedro Nunes pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

Aos meus colegas de laboratório do Instituto Pedro Nunes, Victor, Tati, Toni, Carlos e Adrian, assim como do laboratório no Departamento de Química, Madalina, Rasa e Edilson, pela amizade e o apoio constante, e particularmente à Ana, Madi, Carla e Dora pelos bons conselhos na escrita da tese. Ao Humberto e à Alice, minha “família adoptiva” em Portugal, agradeço o carinho e a disponibilidade oferecida. Um abraço afectuoso à minha amiga Ramona.

Ao meu amado marido Alex Cojuhovski pela motivação permanente, carinho e compreensão durante estes longos anos. À minha irmã Alexandra, à minha mãe e aos meus avós agradeço o amor imutável e o auxílio permanente, sem o qual não poderia ter aceite uma proposta tão longe de casa.

RESUMO

A interacção de vários complexos de Pd com o ADN em dupla hélice foi estudada com um biossensor electroquímico com ADN, com o objectivo de compreender a acção *in vivo* sobre o ADN destes possíveis novos fármacos anticancro. O mecanismo da interacção foi investigado *in situ* com o ADN em dupla hélice imobilizado na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo, o estudo sendo direccionado para a detecção electroquímica de biomarcadores de dano oxidativo, a 8-oxoguanina e a 2,8-dihidroxiadenina. Através da caracterização voltamétrica dos complexos de Pd e dos seus componentes, nomeadamente paládio e os ligandos biogénicos ácido lipóico, espermidina e espermina, foi mostrado que é necessária uma boa compreensão do comportamento redox destas substâncias para avaliar o mecanismo de interacção com o ADN.

O comportamento electroquímico do paládio é complexo, correlacionado com a formação de diversas nanoestruturas obtidas através do controlo de diferentes parâmetros. A interacção dos iões de Pd²⁺ com o ADN é específica, rápida e estável, e relacionada com a desnaturação local da dupla hélice e mudanças conformacionais.

O estudo electroquímico do ácido α -lipóico mostrou a sua oxidação irreversível a ácido β -lipóico, um produto biológico conhecido também como o protogénio B. O ácido α -lipóico actua como ligando num complexo com o Pd, cuja interacção com o ADN não levou à formação de resíduos mutagénicos. O complexo Pd-ácido lipóico foi dissociado após a aplicação de elevados potenciais positivos e negativos.

Os resultados de voltametria para o estudo das poliaminas biogénicas espermidina e espermina mostraram uma electro-oxidação irreversível num processo dependente de pH, encontrando-se completamente protonadas em meio ácido. A sua interacção com o ADN é específica devido às cadeias policationicas que interagem por forças electrostáticas com a dupla hélice do ADN e a estabilizam. Complexos multinucleares de Pd com ligandos de poliaminas mostraram uma interacção rápida com o ADN, devido à presença de múltiplos centros de alquilação, e à libertação da base guanina, o que indica alguma desnaturação da estrutura de dupla hélice, mas sem causar danos oxidativos.

ABSTRACT

The interaction of several Pd complexes with DNA was studied using a dsDNA electrochemical biosensor, with the aim of understanding the *in vivo* DNA interaction of these potential new anticancer drugs. The mechanism of interaction was investigated *in situ* with the dsDNA immobilized on the surface of a glassy carbon electrode, the study being directed to the electrochemical detection of oxidative damage biomarkers, 8-oxoguanine and 2,8-dihydroxyadenine. Through voltammetric characterization of the Pd complexes and their components, palladium and the biogenic ligands lipoic acid, spermidine and spermine, it was shown that a good understanding of the redox behavior of these compounds is necessary in order to assess the mechanism of interaction with DNA.

The electrochemical behavior of palladium is complex, correlated with the formation of different nanostructures that can be obtained by the control of certain parameters. The interaction of Pd²⁺ ions with dsDNA is specific, rapid and stable, and leads to local denaturation and conformational changes of the DNA double helix.

The electrochemical study of α -lipoic acid showed its irreversible oxidation to β -lipoic acid, a biological product also known as protogen B. The α -lipoic acid acts as a ligand in a Pd complex, whose interaction with DNA caused no oxidative damage to DNA. The Pd-lipoic acid complex was found to dissociate by applying high negative or high positive potentials.

The results of the voltammetric study of biogenic polyamines spermidine and spermine showed their irreversible electro-oxidation in a pH dependent process and complete protonation in acidic media. Their interaction with DNA is specific and due to the polycationic chains that interact by electrostatic forces and stabilize the DNA double helix. Multinuclear complexes of Pd with polyamine ligands showed a rapid interaction with DNA due to the presence of multiple alkylation centers. The release of the purinic base guanine was also observed, indicating some denaturation of the double helix structure, but no oxidative damage caused to DNA was detected.

ÍNDICE

NOTAÇÃO: SÍMBOLOS PRINCIPAIS

SUBSCRITOS

ABREVIATURAS

CONSTANTES FÍSICAS FUNDAMENTAIS

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
1.1 O Ácido Desoxirribonucleico	4
1.1.1 Nucleotídeos e Ácidos Nucleios	6
1.1.2 A dupla hélice do ADN	12
1.1.3 O polimorfismo do ADN	18
1.1.4 Danos no ADN	19
1.2 A electroquímica do ADN	25
1.2.1 Propriedades electroquímicas do ADN	25
1.2.1 Biossensores electroquímicos com ADN	31
1.3 Paládio	35
1.3.1 Breve nota historica	36
1.3.2 Paládio nos sistemas biológicos	39
1.3.3 A electroquímica do paládio	43
1.4 Complexos de metais como agentes anti-cancro	46
1.4.1 Complexo de paládio com o ácido lipóico	46
1.4.2 Complexos de platina	48
1.4.3 Complexos multinucleares de paládio com poliaminas biogénicas	51
1.4.4 Ligandos	53
1.4.4.1 Ácido α - lipóico	53
1.4.4.2 Poliaminas biogénicas: espermidina e espermina	56

1.5	Electroquímica na caracterização e uso de eléctrodos modificados e biossensores	62
1.5.1	Princípios de electroquímica	62
1.5.2	Eléctrodos de carbono	65
1.5.3	Técnicas de voltametria	67
1.5.1.1	Voltametria cíclica(CV).....	68
1.5.1.2	Voltametria de impulso diferencial(DPV).....	73
1.5.1.3	Voltametria de onda quadrada(SWV).....	75

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL	77
2.1 Reagentes e soluções	79
2.2 Instrumentação.....	82
2.3 Condições experimentais.....	84
2.3.1 Preparação da superfície do GCE	84
2.3.2 Modificação da superfície do GCE com DNA	84
2.3.3 Procedimentos experimentais	85
2.4 Análise das amostras comerciais	86

CAPÍTULO 3

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO PALÁDIO

E DA INTERACÇÃO COM O ADN	89
3.1 Introdução.....	91
3.2 Cloreto de paládio.....	93
3.2.1 A voltametria do paládio em solução.....	93
3.2.2 Nanoestruturas de paládio electrodepositado nos eléctrodos de carbono	98
3.3 Sulfato de paládio	108
3.3.1 A voltametria do paládio em solução.....	108
3.3.2 Adsorção espontânea do paládio nos eléctrodos de carbono.....	114
3.3.3 Nanoestruturas de paládio electrodepositado nos eléctrodos de carbono	116
3.4 Nitrato de paládio e tetracloropaladato de potássio.....	125
3.5 A interacção dos iões de Pd ²⁺ com o ADN	127
3.6 Conclusões.....	134

CAPÍTULO 4

ESTUDO ELECTROANALÍTICO DO ÁCIDO α-LIPÓICO	135
4.1 Introdução.....	137
4.2 Voltametria cíclica.....	138
4.3 Voltametria de impulso diferencial	142
4.4 Voltametria de onda quadrada.....	145

4.5	Determinação analítica do ácido α -lipóico.....	146
4.6	Detecção do ácido α -lipóico em amostras comerciais	148
4.7	Conclusões	150

CAPÍTULO 5

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO PALÁDIO – ÁCIDO LIPÓICO

E DA INTERACÇÃO COM O ADN	151	
5.1	Introdução.....	153
5.2	Comportamento redox do complexo Pd-LA e do <i>Poly-MVATM</i>	154
5.3	Electrodeposição do complexo Pd-LA e do <i>Poly-MVATM</i>	162
5.4	A interacção do complexo Pd-LA e do <i>Poly-MVATM</i> com o ADN.....	166
5.5	Conclusões.....	172

CAPÍTULO 6

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA ESPERMIDINA E ESPERMINA.

A INTERACÇÃO COM O ADN	173	
6.1	Introdução.....	175
6.2	Voltametria cíclica.....	176
6.3	Voltametria de onda quadrada.....	179
6.4	Voltametria de impulso diferencial e estudo de pH	181
6.5	A interacção da espermidina e da espermina com o ADN.....	187
6.6	Conclusões.....	190

CAPÍTULO 7

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE COMPLEXOS MULTINUCLEARES DE

PD(II) COM POLIAMINAS BIOGÉNICAS. A INTERACÇÃO COM O ADN.....	191	
7.1	Introdução.....	193
7.2	Estudo voltamétrico	195
7.3	Electrodeposição dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp.....	201
7.4	A interacção dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp com o ADN	204
7.5	Conclusões	209

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES	211
-------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	217
---------------------------	------------

Notação: Símbolos Principais

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

Subscritos

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

Abreviaturas

8-oxoG	8-oxoguanina
2,8-DHA	2,8-dihidroxiadenina
A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	microscopia de força atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
ARN	ácido ribonucleico
C	citosa
CV	voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
dsDNA	ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia (<i>double stranded Desoxyribonucleic acid</i>)
DPV	voltametria de impulso diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
G	guanina
GCE	eléctrodo de carbono vítreo (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
HOPG	grafite pirolítica altamente orientada (<i>Highly Ordered Pyrolytic Graphite</i>)
SWV	voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
T	timina

Constantes físicas fundamentais

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

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O papel desenvolvido pelos iões metálicos na estrutura, estabilidade e reactividade do ácido desoxirribonucleico (ADN) em dupla hélice está bem documentado. Também tem sido reconhecido que os ácidos nucleicos não podiam exercer as suas funções biológicas sem a participação dos iões metálicos que estão envolvidos nos processos de replicação e de transcrição. Estes factos proporcionaram um grande interesse na investigação da interacção entre os iões metálicos e os seus complexos com os ácidos nucleicos. Um outro factor determinante surgiu com a utilização eficaz de complexos de platina, como a cisplatina, como agentes antitumoral. Consequentemente, a presente investigação está direccionada para a caracterização electroquímica de complexos metálicos, com uso em medicina e outras aplicações biológicas, e para a determinação e avaliação da sua interacção específica com o ADN.

Os complexos metálicos interagem com o ADN por intercalação, por forças electrostáticas e pela coordenação directa com os ácidos nucleicos e, além de influenciar a estabilidade da estrutura duplo helicoidal, podem causar danos de natureza oxidativa. Estes danos oxidativos podem induzir mutações pontuais que por fim podem originar disfunções celulares e neoplasias. Por isso, o estudo de oxidação do ADN e a detecção de danos oxidativos é de uma importância fundamental.

A investigação no desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos conduziu a síntese de complexos de Pd com ligandos biogénicos, não só para uma interacção mais eficaz com o ADN através de geometrias moleculares únicas, mas também para diminuir os efeitos tóxicos relacionados com a quimioterapia clássica. O trabalho aqui

apresentado insere-se neste contexto, na medida em que apresenta o estudo da interacção entre complexos de Pd e o ADN.

O desenvolvimento de biossensores com ADN oferece uma alternativa promissora para uma análise rápida, pouco dispendiosa e mais simples, sem a necessidade de purificação e amplificação das amostras em ensaios complexos, morosos e propensos à contaminação. Os biossensores electroquímicos com ADN são dispositivos que utilizam os ácidos nucleicos como o agente biológico de reconhecimento molecular por intermédio de um transdutor, o eléctrodo, em cuja superfície o ADN é imobilizado. Além disso, as técnicas electroquímicas constituem ferramentas adequadas para o estudo de sistemas biológicos, devido a capacidade de análise directa, em tempo real, dos processos de reconhecimento que ocorrem na superfície do eléctrodo.

O trabalho experimental efectuado e discutido nesta dissertação apresenta o estudo de interacção *in situ* entre vários complexos de Pd com ligandos biogénicos e o ADN, utilizando um eléctrodo de carbono vítreo modificado com ADN em dupla hélice, para uma melhor compreensão do possível mecanismo de acção *in vivo* sobre o ADN.

Deste modo, primeiro foi feita uma caracterização sistemática dos complexos de Pd e os seus componentes, nomeadamente paládio e os ligandos biogénicos ácido lipóico, espermidina e espermina, e em seguida uma avaliação voltamétrica do mecanismo de interacção destes complexos com a dupla hélice do ADN, com especial atenção para a monitorização e detecção dos biomarcadores de dano oxidativo, a 8-oxoguanina e a 2,8-dihidroxiadenina.

1.1 O Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Os compostos de fósforo e nitrogénio foram descritos como ácidos nucleicos e isolados de células pela primeira vez em 1870 por Friedrich Miescher, mas foram considerados durante muito tempo como uma curiosidade. Em 1909 as estruturas das unidades monoméricas, os nucleotídeos, foram estabelecidas, e em 1935 a estrutura correcta de um polinucleotídeo das cadeias do ácido desoxirribonucleico (ADN) e do ácido ribonucleico (ARN) foi proposta por Phoebus Levene e Stuart Tipson [1].

Apesar do facto de Levene ter deduzido a estrutura correcta para os polinucleotídeos, não chegou a um entendimento mais profundo desta estrutura devido as quantidades aproximadamente iguais das quatro bases encontradas no ADN ou no ARN. Levene assumiu que os ácidos nucleicos deveriam ser polímeros repetidos e regulares para os quais não existia qualquer função biológica óbvia. A ideia sobre o armazenamento da informação genética estava associada a arranjos de proteínas, e não de ácidos nucleicos, ao longo do cromossoma.

Só em 1944, com a descoberta de Oswald T. Avery e colaboradores que o ácido nucleico do tipo desoxirribose “é o princípio transformador” responsável pela transformação da forma não patogénica na forma patogénica da bactéria *Streptococcus Pneumoniae* [2], surgiram provas suficientes que o ADN contém informação genética.

Alguns anos mais tarde, em 1952, Alfred D. Hershey e Martha Chase demonstraram definitivamente que são os ácidos nucleicos, e não as proteínas, os únicos capazes de infectar (transfectar) a bactéria *Escherichia Coli* [3]. Este trabalho constituiu o segundo marco decisivo para a identificação do ADN como a macromolécula responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética.

O reconhecimento da estrutura duplo-helicoidal do ADN [4] por James Watson e Francis Crick em 1953, e o mecanismo de replicação que esta estrutura revelou, foram as evidências concretas que prepararam o caminho para o conhecimento detalhado do ADN, ARN e o mecanismo de codificação das proteínas.

Watson e Crick propuseram que o ADN é uma hélice dupla com as duas cadeias de polinucleotídeos antiparalelas. A estrutura foi deduzida a partir de um modelo construído com o conhecimento dos dados de difracção de raios-X dos cristais de ADN obtidos por Maurice F. Wilkins e Rosalind Franklin [5, 6]. Uma informação adicional fundamental foi a descoberta de Erwin Chargaff que em todo o ADN em dupla hélice o conteúdo de adenina é igual ao de timina, e o conteúdo de guanina iguala o de citosina.

A característica mais significativa da estrutura proposta foi o emparelhamento das bases no centro da hélice por pontes de hidrogénio. As pontes de hidrogénio poderiam formar-se dessa maneira apenas no caso da adenina (A) formar duas ligações com a timina (T), e a citosina (C) formar três ligações com a guanina (G). Assim, a sequência de nucleotídeos numa cadeia é complementar, mas não idêntica, a outra

cadeia. Foi imediatamente aparente que a sucessão de bases numa cadeia de ADN têm que carregar a informação genética codificada. A complementaridade das duas cadeias sugeriu um mecanismo simples para a replicação de genes durante a divisão da célula. As duas cadeias poderiam separar-se e uma cadeia complementar poderia ser sintetizada para cada uma delas, resultando duas moléculas de ADN, uma para cada duas células-filhas. A exactidão do conceito proposto foi assim provada.

Destas descobertas resultaram desenvolvimentos importantes na década de 1970: foram encontrados métodos para cortar e reunir fragmentos de ADN e para a sua clonagem em bactérias, como também foram inventados métodos para a determinação rápida de sequências de nucleotídeos. A aplicação destas técnicas contribuíram para os avanços surpreendentes de hoje em biologia e medicina.

1.1.1 Nucleotídeos e Ácidos Nucleicos

Os nucleotídeos e os ácidos nucleicos são moléculas biológicas que possuem bases azotadas heterocíclicas como componentes principais das suas estruturas. A importância bioquímica dos nucleotídeos é reconhecida, pois eles participam como intermediários essenciais em quase todos os aspectos do metabolismo celular. Os ácidos nucleicos servem um propósito biológico ainda mais central, sendo os elementos da hereditariedade e os agentes da transferência de informação genética. Da mesma maneira que as proteínas são polímeros lineares de aminoácidos, os ácidos nucleicos são polímeros lineares de nucleotídeos [7], e a sucessão em ordem dos resíduos de nucleotídeos codifica a informação genética.

Os dois tipos básicos de ácidos nucleicos são o ácido desoxirribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN). A hidrólise completa dos ácidos nucleicos libera bases azotadas, um açúcar e ácido fosfórico em quantidades iguais [8].

As bases azotadas geralmente encontradas nos nucleotídeos e nos ácidos nucleicos são derivadas de pirimidina ou de purina. As pirimidinas são anéis aromáticos heterocíclicos com seis átomos e contêm dois átomos de nitrogênio. Os átomos são numerados no sentido dos ponteiros do relógio, como mostrado na **Fig. 1.1A**. A estrutura da purina é representada pela combinação de um anel pirimidínico com um anel imidazol de cinco átomos, originando um sistema de nove átomos numerados de

acordo com a convenção mostrada na **Fig. 1.1B**. O anel pirimidínico é planar, enquanto que o sistema purínico diverge um pouco da planaridade tendo um ângulo entre os seus anéis imidazol e pirimidínico. Ambos são pouco solúveis em água [8], tendo um caráter aromático pronunciado.

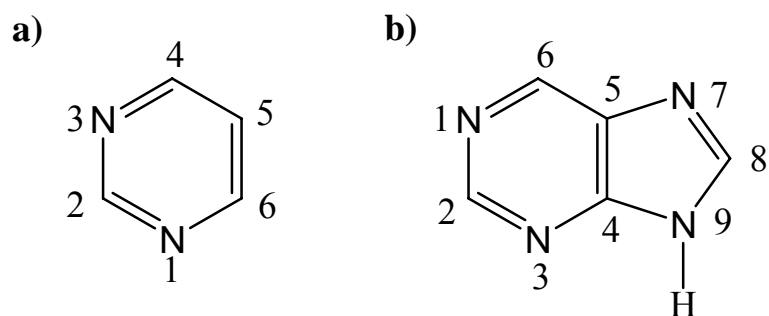


Figura 1.1 – a) o anel pirimidínico e b) o sistema purínico.

As pirimidinas naturalmente ocorrentes são citosina (4-amino-2-oxopirimidina), timina (5-metil-2,4-dioxopirimidina) e uracil (2,4-dioxopirimidina), **Fig. 1.2**. A citosina e a timina são tipicamente as pirimidinas encontradas no ADN, enquanto que a base uracil é comum apenas no ARN, substituindo o lugar da base timina. A adenina (6-aminopurina) e a guanina (2-amino-6-oxopurina) são as duas bases purínicas comuns tanto no ADN como também no ARN, **Fig. 1.2**.

Além dos nucleosídeos básicos, derivados das bases heterocíclicas adenina, guanina, citosina, timina e uracil, existe uma vasta variedade de nucleosídeos modificados, de ocorrência natural ou modificados quimicamente, que além do papel estrutural podem apresentar funções independentes [7].

Os açúcares dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos são designados por pentoses, contendo cinco átomos de carbono. O ARN contém a pentose D-ribose, enquanto que no ADN encontra-se a 2-desoxi-D-ribose. Nos dois exemplos a pentose forma o anel conhecido como furanose: D-ribofuranose para o ARN e 2-desoxi-D-ribofuranose para o ADN, **Fig. 1.3**. Quando estes ribofuranoses encontram-se no nucleotídeo, os átomos são numerados como 1', 2', 3' de maneira a distingui-los dos átomos das bases azotadas.

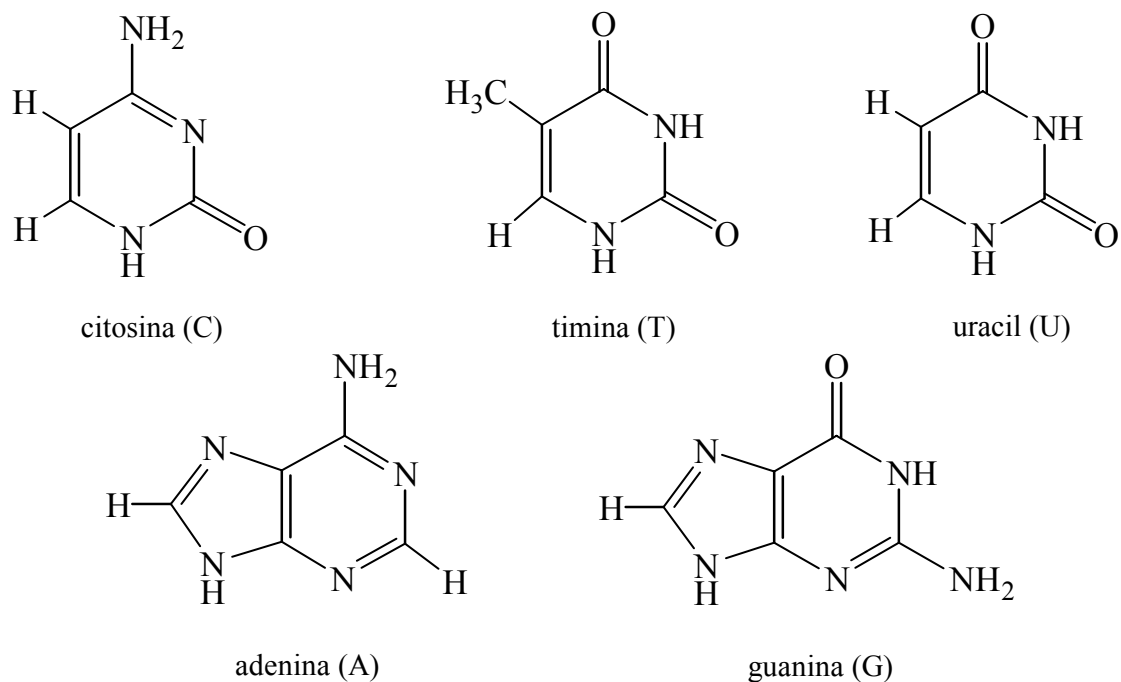


Figura 1.2 – Estrutura química das bases do ADN e ARN.

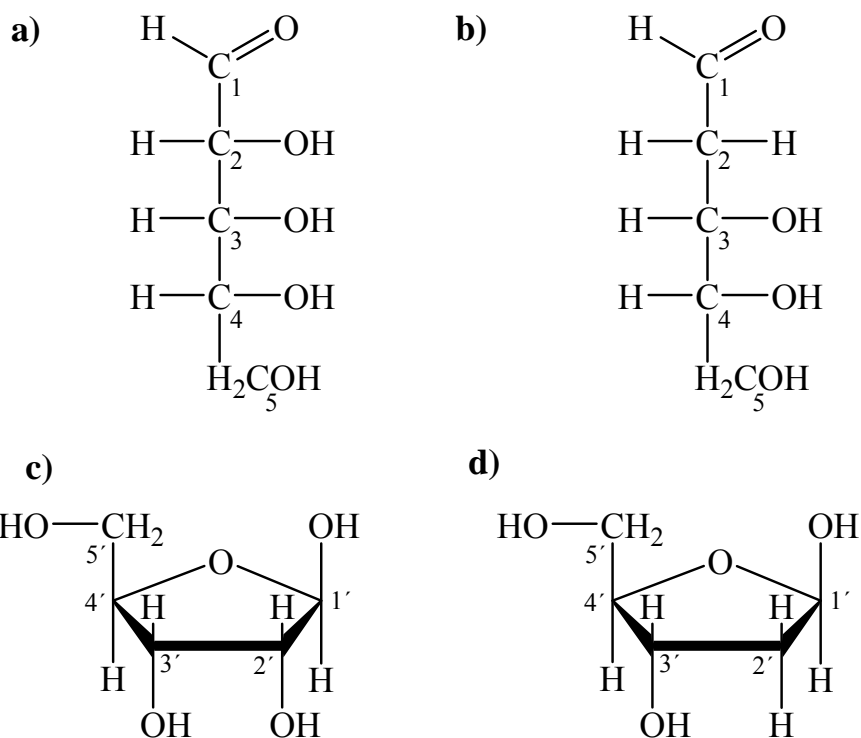


Figura 1.3 – Açúcares: **a,b)** formas planaras da **a)** D-ribose e **b)** D-2-desoxirribose e **c,d)** forma cíclica furanósica da **c)** β-D-ribose no RNA e da **d)** β-D-2'-desoxirribose no ADN.

Os nucleosídeos são formados unindo uma base azotada a um açúcar por uma ligação glicosídica, **Fig. 1.4**. Por definição, a ligação glicosídica envolve o átomo de carbono do grupo carbonil do açúcar, que nas estruturas cíclicas é unido ao átomo de oxigênio do anel. Estes átomos de carbono são designados por anoméricos. Nos nucleosídeos, a ligação é N-glicosídica porque conecta o carbono anomérico C1 para o átomo N1 de uma pirimidina ou para o N9 de uma purina.

As ligações glicosídicas podem ser de tipo α - ou β -, dependendo da orientação relativa ao átomo de carbono anomérico. A ligação glicosídica nos nucleosídeos e nucleotídeos é sempre na configuração β -, como representado na **Fig. 1.4**. Os nucleosídeos são nomeados adicionando o sufixo *-idina* para a raiz do nome de uma base pirimidínica (citidina, timidina, uridina), e o sufixo *-osina* para a raiz do nome de uma base purínica (guanosina, adenosina).

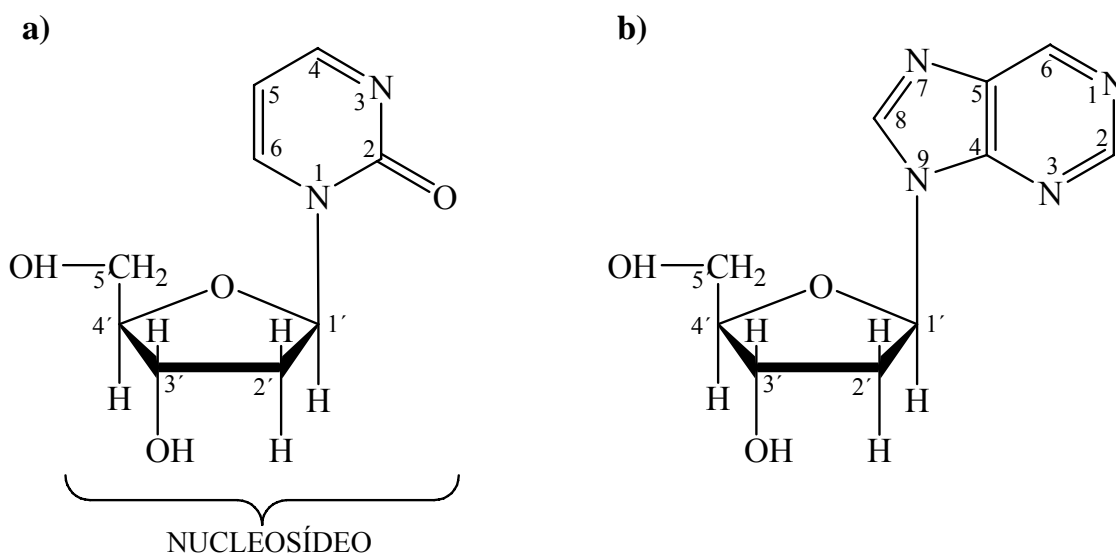


Figura 1.4 – Formação de um nucleosídeo através de uma ligação
a) N1-glicosídica para pirimidinas e b) N9-glicosídica para purinas.

Os nucleosídeos são mais solúveis em água do que as bases livres, devido a hidrofilicidade dos açúcares, e são relativamente estáveis em meio alcalino. Os nucleosídeos pirimidínicos também são resistentes a hidrólise ácida, enquanto os

nucleosídeos purínicos são facilmente hidrolisados em meio ácido, originando a base livre e a pentose.

Um nucleotídeo, **Fig. 1.5**, resulta quando um ácido fosfórico está esterificado a um grupo $-OH$ de um açúcar que pertence a um nucleosídeo. Dos grupos hidroxil disponíveis para esterificação, no $C2'$ (só no caso dos ribonucleosídeos), $C3'$ e $C5'$, a vasta maioria dos nucleotídeos monoméricos nas células são ribonucleotídeos com grupos $5'$ -fosfato. Nucleosídeos $2'$ - e $3'$ -fosfato não ocorrem naturalmente, mas são bioquimicamente importantes como produtos da hidrólise dos polinucleotídeos ou dos ácidos nucleicos [8].

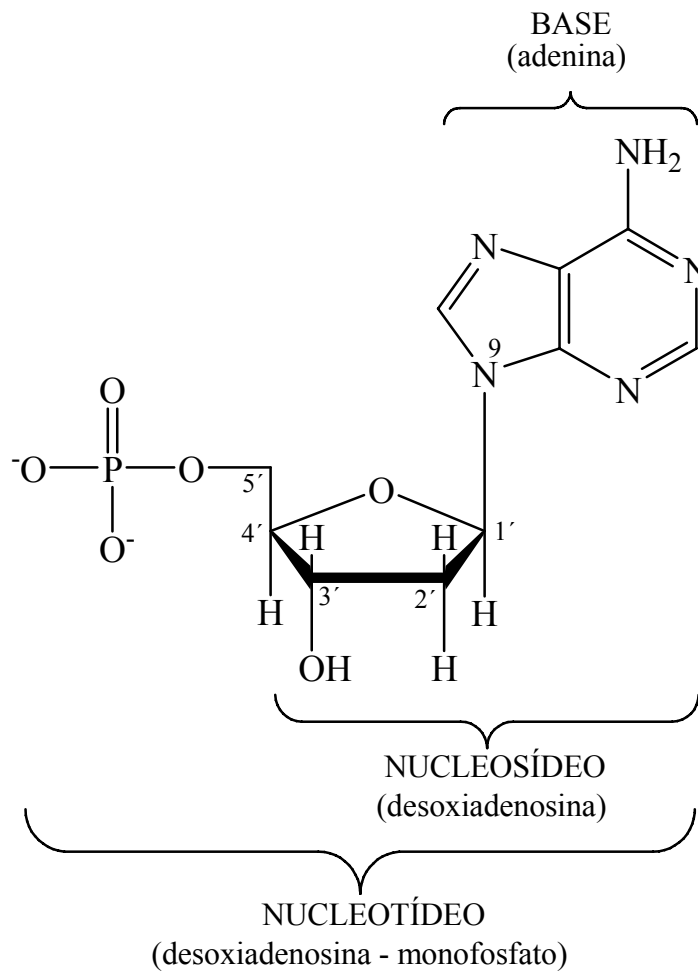


Figura 1.5 – Exemplo de nucleotídeo: a base - adenina, o nucleosídeo - desoxiadenosina e o nucleotídeo - adenosina monofosfato.

Os nucleotídeos têm propriedades ácidas devido ao valor do pKa para a primeira dissociação de um próton do grupo fosfato, de $\leq 1,0$ [8]. Esta acidez está implícita nos outros nomes pelos quais estas substâncias são conhecidas: ácido adenílico, ácido guanílico, ácido citidílico, ácido timidílico e ácido uridílico. Os ácidos nucleicos, como polímeros de nucleosídeos-monofosfato, derivam os seus nomes da acidez destes grupos de fosfato.

Grupos de fosfato adicionais podem ser acrescentados ao grupo fosfato de um nucleotídeo criando nucleosídeos di- e tri-fosfato com funções bem definidas no metabolismo celular. Virtualmente todas as reações bioquímicas dos nucleotídeos envolvem a transferência de um grupo fosfato, como fonte principal de energia química, enquanto a pentose e a base não estão envolvidas directamente neste processo.

Os vários nucleotídeos direccionam processos metabólicos apropriados através do reconhecimento específico da base de um nucleotídeo, as bases servindo somente como símbolos de informação. Este papel como símbolos de informação estende-se aos polímeros de nucleotídeos, os ácidos nucleicos, onde as bases servem como símbolos de informação para o código de informação genética. Para formar uma cadeia polinucleotídica as unidades nucleosídeo-monofosfato estão ligadas por intermédio de ligações 3',5'-fosfodiéster, **Fig. 1.6**.

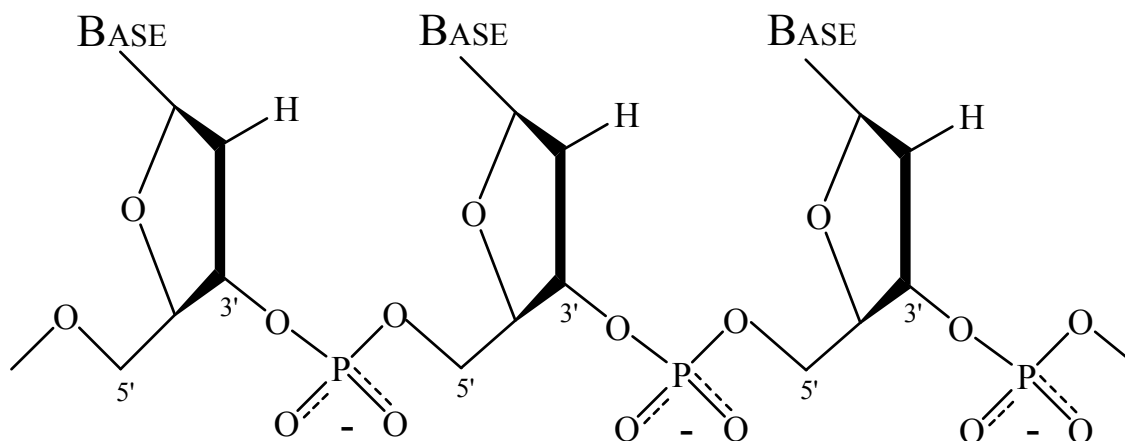


Figura 1.6 – Estrutura química, secundária, de uma cadeia de ADN.

A conexão fosfodiéster entre os desoxinucleotídeos individuais conecta o grupo hidróxilo do C5' de um nucleotídeo com o grupo hidróxilo do C3' do seguinte nucleotídeo, introduzindo direccionalidade. Nesta configuração, as partes açúcar–fosfato representam o esqueleto dos ácidos nucleicos com função apenas estrutural. Os grupos fosfato estão carregados negativamente, o que confere ao ADN uma carga global negativa.

1.1.2 A dupla hélice do ADN

O modelo tridimensional do ADN, proposto em 1953 por James Watson e Francis Crick [4] a partir dos estudos por difracção de raios X de cristais de um sal de ADN, efectuados por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins [5], [6], descreve a estrutura da forma B do ADN (B-ADN), normalmente presente nas células é considerada a estrutura padrão do ADN.

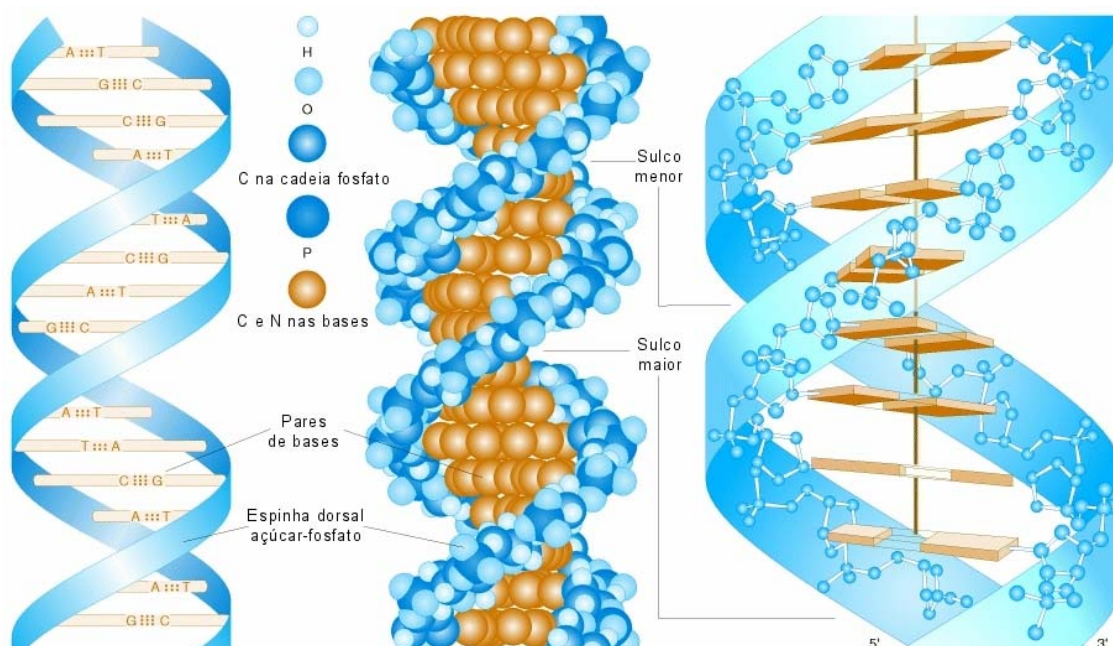


Figura 1.7 - Representações da hélice dupla do ADN. Adaptado de [9].

Neste modelo, **Fig. 1.7**, o ADN apresenta duas cadeias de polinucleotídeos dispostas ao longo de um eixo comum, enroladas numa dupla hélice dextrógira (rodada

sobre o eixo longitudinal da esquerda para a direita) regular, com um diâmetro de 20 Å e aproximadamente 10 pares de bases por passo da hélice. A estrutura repete-se em cada 34 Å. A hélice faz uma revolução completa após aproximadamente 10 nucleotídeos.

As duas cadeias complementares da dupla hélice do ADN são anti-paralelas, com as duas direcções 5'→3' opostas, e são mantidas unidas na estrutura de dupla hélice por pontes de hidrogénio, **Fig. 1.8**. As pontes de hidrogénio ligam as bases de um nucleotídeo de uma das cadeias com as bases complementares da outra. Este emparelhamento protege assim as bases no interior hidrofóbico da dupla hélice.

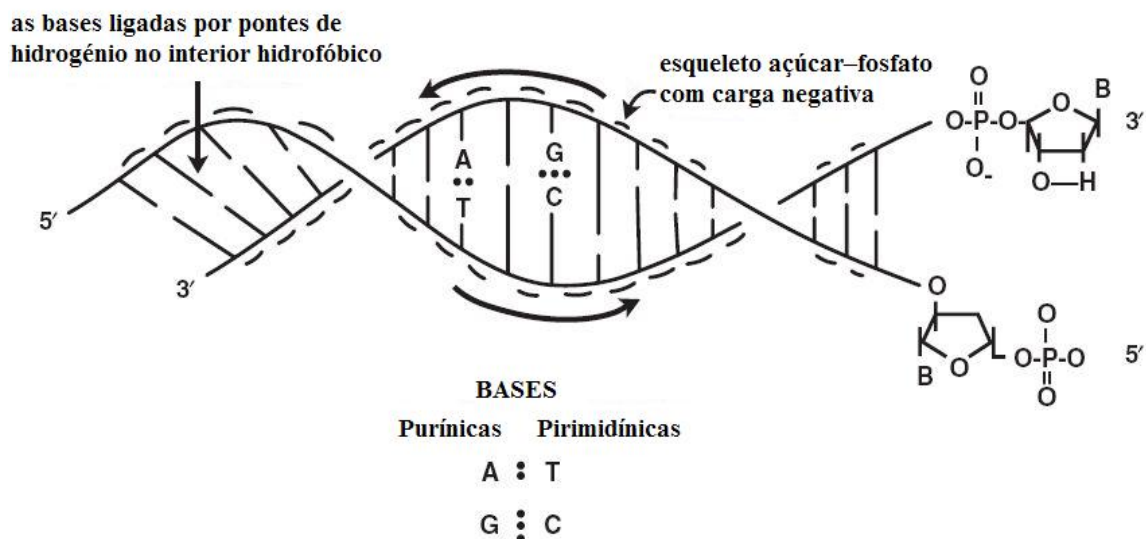


Figura 1.8 – Representação esquemática das ligações entre os pares de bases complementares, a direccionalidade e a polaridade das cadeias na dupla hélice de ADN. Adaptado de [10].

As ligações de hidrogénio entre as pares de bases são de tal forma que a configuração energeticamente favorável é encontrada quando a adenina emparelha com a timina, através de duas pontes de hidrogénio, e a guanina com a citosina, com três pontes de hidrogénio. Embora os requisitos espaciais para a formação do B-ADN permitam quatro pares de bases (GT, GC, AT, AC), só os pares GC e AT são normalmente encontrados no ADN, designadas por pares de bases Watson-Crick.

A relação espacial entre as duas cadeias polinucleotídicas cria na estrutura de dupla hélice do ADN um sulco maior e um sulco menor, **Fig. 1.9**. Muitas das interações específicas com o ADN acontecem ao longo do sulco maior por as bases estarem mais expostas ao longo deste sulco.

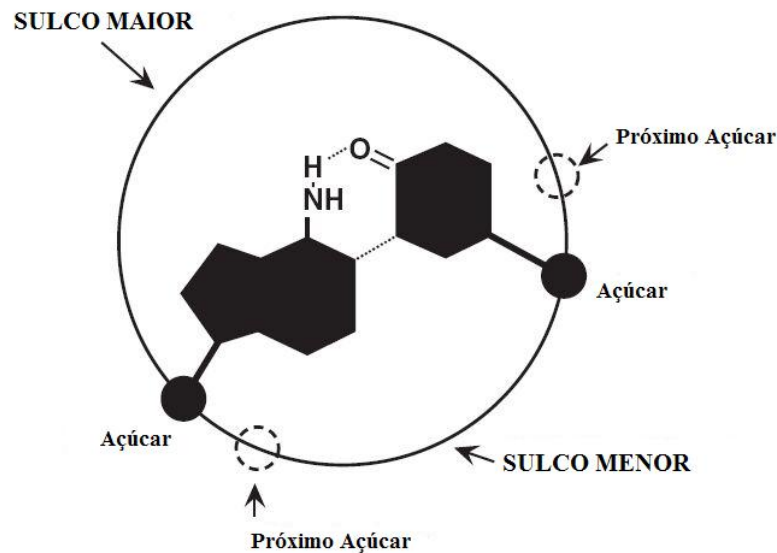


Figura 1.9 – Representação de uma secção transversal na dupla hélice de ADN; orientação das bases complementares e dos açúcares. Adaptado de [10].

O facto de alguns grupos nas bases estarem suficientemente acessíveis para permitirem interações com moléculas pequenas, proteínas e outras cadeias polinucleotídicas é uma característica importante das propriedades e da função do ADN. O sulco menor apresenta uma densidade de carga negativa elevada devido a proximidade dos grupos fosfato.

O ADN assume a estrutura já mencionada, B-ADN, em condições de humidade alta e encontra-se nesta forma na maioria das células. Porém, os ácidos nucleicos também ocorrem naturalmente em outras formas duplo-helicoidais. O arranjo de emparelhamento das bases permanece o mesmo, mas os agrupamentos açúcar-fosfato que constituem a coluna vertebral da estrutura são inerentemente flexíveis e podem adoptar conformações diferentes em função da sequência das bases, concentração de iões, temperatura e humidade relativa [7].

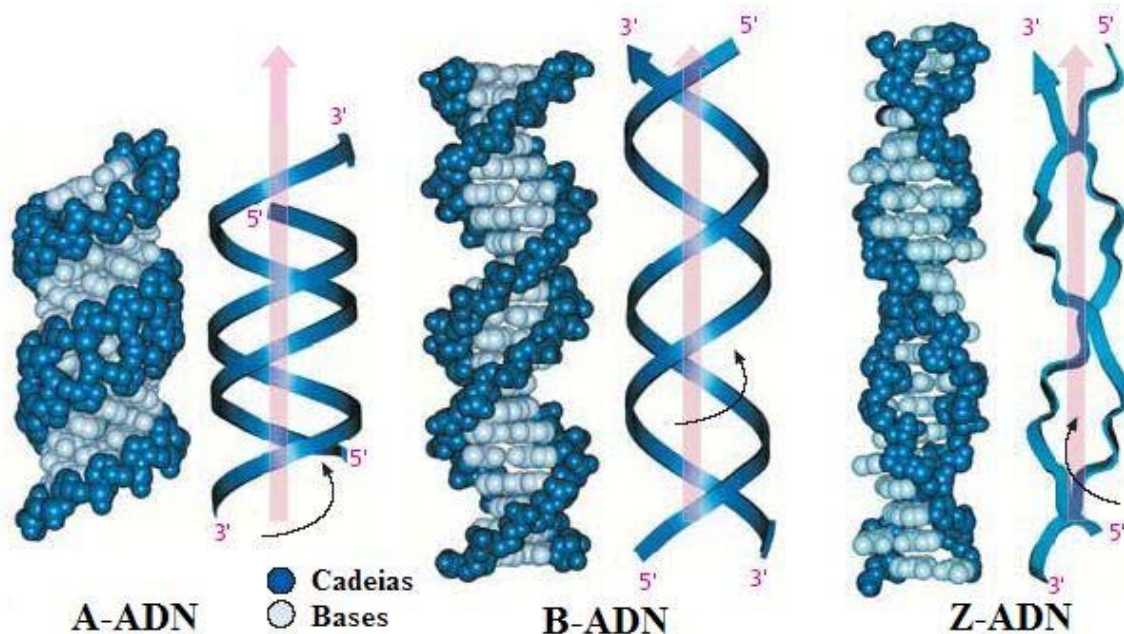


Figura. 1.10 – Estruturas de A-ADN, B-ADN e Z-ADN. Adaptado de [11].

Quando o ADN é fortemente desidratado (em condições de humidade relativa inferior a 75%), o B-ADN efectua um transição estrutural para a forma A-ADN [12]. Esta forma é mais compacta, com 11 pares de bases numa volta completa da hélice e apresenta uma inclinação maior relativamente ao eixo da hélice, **Fig. 1.10**. Esta alteração conformacional diminui substancialmente o volume delimitado pelo sulco menor. O ADN também pode adoptar a forma Z [13], que apresenta o sentido de rotação para a esquerda (levógira), sendo mais alongada e mais fina do que o B-ADN. Para completar uma volta na hélice são necessários 12 pares de bases. As características conformacionais fazem com que o esqueleto açúcar-fosfato de cada uma das cadeias descreva um “zig-zag”, razão por que se designa esta forma por Z-ADN. Em solução com alta concentração de catiões, o ADN assume a conformação Z.

Variações conformacionais podem aparecer localmente dentro da molécula de ADN, devido a sequência específica de pares de bases ao longo da cadeia de ADN. Além dos pares de bases Watson-Crick entre GC, AT (no ADN) e entre AU (no ARN), podem ocorrer várias outras interligações por ligações de hidrogénio entre as bases, como ligações Hoogsten, Wobble, Watson-Crick invertidas, tripletos ou quartetos de bases [7, 14], **Fig. 1.11**, conduzindo a uma grande diversidade de estruturas de ácidos nucleicos.

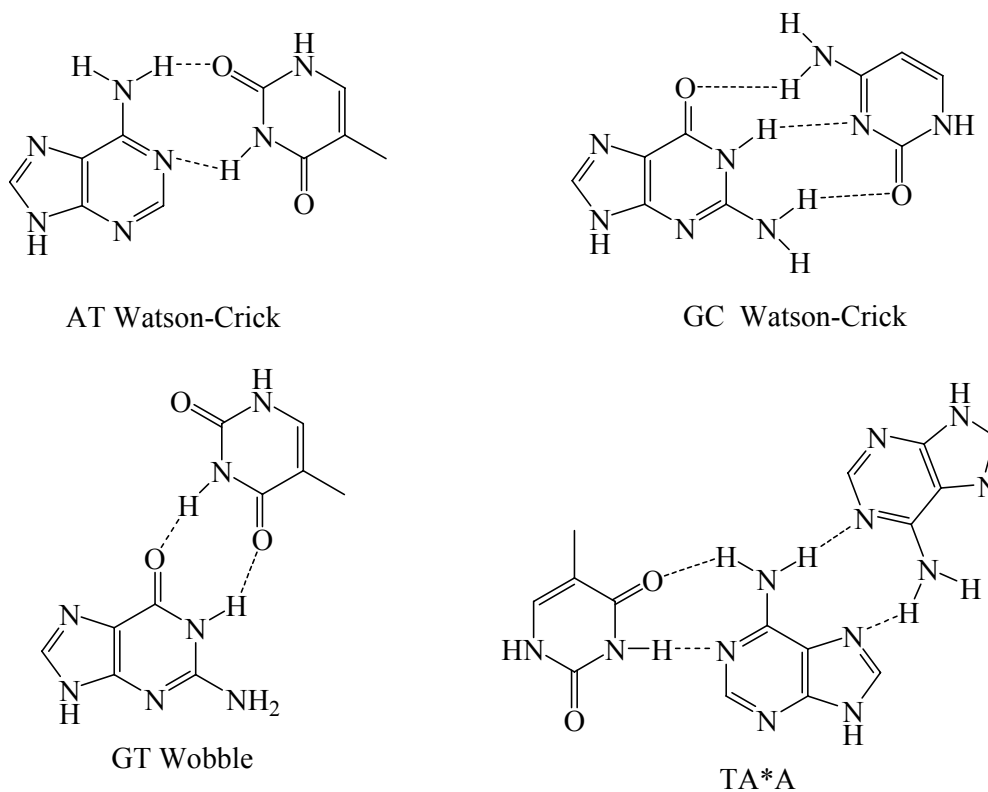


Figura 1.11 – Exemplos de pares de bases existentes no ADN e ARN.

Um exemplo de variação conformacional é a torção das ligações de hidrogénio entre as bases, que permite maior sobreposição entre bases sucessivas ao longo de uma cadeia de ADN e diminui a área de contacto entre as bases e o meio exterior [8]. Outras variações conformacionais, como uma tensão externa [7], uma inclinação no plano duma base, ou um par inteiro de bases rodando vários graus relativamente ao seu eixo [15], levam a estruturas pouco usuais que se podem formar localmente no interior da molécula de ADN [14, 16], **Fig. 1.12**.

A dupla hélice do ADN é estabilizada por interações hidrofóbicas que são o resultado do emparelhamento das bases individuais e do empilhamento das mesmas no interior hidrofóbico. As pontes de hidrogénio, como no caso das proteínas, contribuem para a estabilidade global da dupla hélice, mas a maior contribuição é a especificidade de formar os pares de bases correctamente. Um par de bases formado incorrectamente não vai contribuir com pontes de hidrogénio suficientes e seria muito menos estável. As ligações van der Waals também contribuem para a estabilidade das estruturas adoptadas pelos ácidos nucleicos.

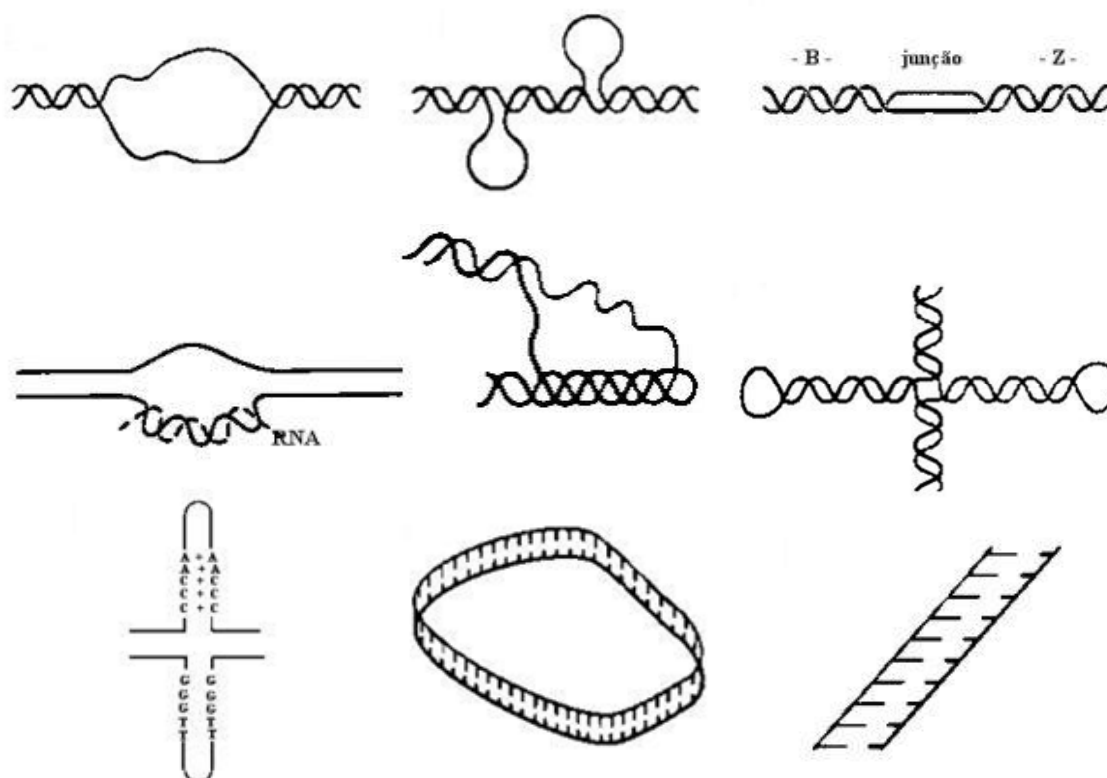


Figura. 1.12 – Estruturas pouco usuais de ADN [14].

A dupla hélice pode ser desnaturada por aquecimento. O ADN desnaturado, como uma proteína desnaturada, perde a sua estrutura e as cadeias separam-se. A desnaturação do ADN é acompanhada por um aumento na absorvância de luz UV ao comprimento de onda de 260 nm. Este efeito é conhecido como hipercromicidade e pode ser usado para observar a desnaturação do ADN. Em condições apropriadas a desnaturação do ADN é reversível e reforma a hélice dupla.

A estabilidade da dupla hélice é também influenciada pelo conteúdo de pares GC. Como um par de bases GC tem três pontes de hidrogénio, enquanto um par AT tem só duas, sequências de ADN ricas em pares GC formam estruturas mais estáveis que as regiões ricas em pares AT. Os grupos fosfato das duas cadeias, carregados negativamente, tem a tendência de se repelir um ao outro, desestabilizando a estrutura de dupla hélice do ADN. Uma força iónica alta protege os grupos fosfato, diminui a repulsão e estabiliza a dupla hélice.

Em conclusão, a conformação do ADN e do ARN é o resultado das interações por ligações de hidrogénio, do empacotamento das bases, da repulsão electrostática entre os fosfatos carregados negativamente e da interação com o solvente [7].

1.1.3 O polimorfismo do ADN

A forma B-ADN é a estrutura mais estável para uma sequência ao acaso de bases no ADN nas condições fisiológicas, e constitui a estrutura de referência em qualquer estudo sobre as propriedades do ADN.

Contudo, hoje sabe-se que o ADN não é uma estrutura linear, estável, monótona e uniforme. O ADN assume também conformações tridimensionais superhelicoidais, sendo definidas como enrolamento das duplas hélices sobre si mesmas [15].

A deformação e formação de super-hélices de ADN linear ou circular, **Fig. 1.13**, aparecem durante vários processos, como a replicação, transcrição e ligação com várias proteínas.

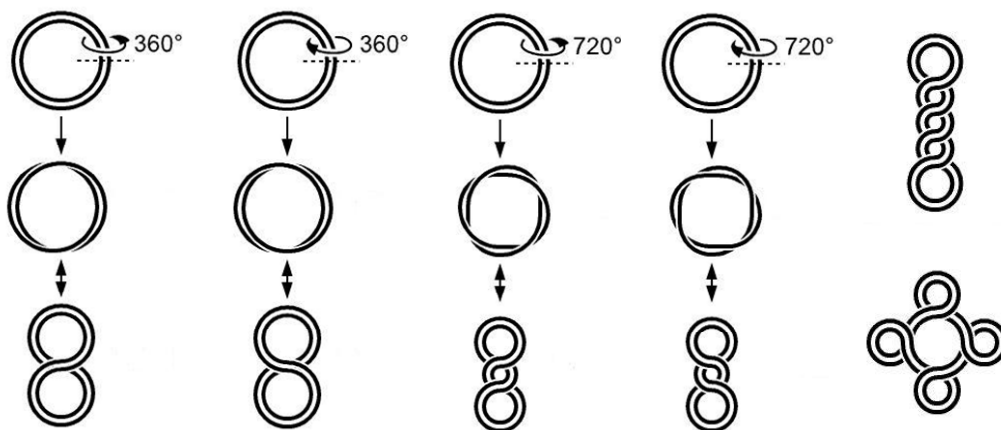


Figura 1.13 – Exemplos de super-hélices de ADN circular [15].

No cromossoma, o ADN é empacotado tão densamente, **Fig. 1.14**, que o menor cromossoma humano contém mais de 50 milhões de pares de bases [8].

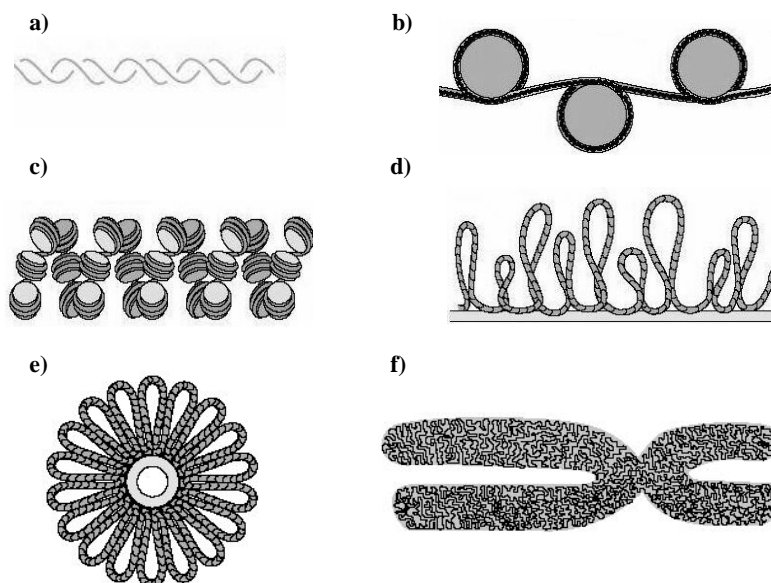


Figura 1.14 – Etapas de condensação do ADN para a formação de um cromossoma [8].

O ADN é embrulhado nitidamente ao redor duma proteína resultando nucleosomas que são empacotados para formar um filamento helicoidal, organizado à volta de uma matriz nuclear. Em seguida, as estruturas assim formadas são condensadas para formar um cromossoma.

1.1.4 Danos no ADN

As lesões no ADN resultam dos danos que ocorrem espontaneamente por processos endógenos ou como resultado da acção de vários agentes externos. Este danos interferem com processos celulares críticos; as ADN-polimerases podem ser bloqueadas no local da lesão ou podem inserir uma base incorrecta no lado oposto da base danificada, conduzindo a uma mutação, ou seja, a uma modificação permanente na estrutura do ADN que produz falhas de informação durante a replicação do ADN.

Numa escala maior, o dano no ADN manifesta-se na citotoxicidade, mutagénese e morte celular, e nos animais superiores, em cancro e envelhecimento. O processo de carcinogénese é considerado exigir múltiplas mutações em genes críticos, e o risco de cancro é reduzido quando o dano potencialmente mutagénico é removido pelo processo de reparação do ADN. Os efeitos destrutivos, mutagénicos e cancerígenos são quase exclusivamente devidos às mudanças induzidas no ADN do núcleo celular. É por esta

razão que tem havido um interesse contínuo para revelar os mecanismos pelos quais varias espécies de moléculas levam a danos biologicamente visíveis.

Ao nível molecular uma das questões que tem atraído mais atenção é se as lesões no ADN ocorrem em sítios específicos. Existem três tipos principais de interacção entre as moléculas e o ADN: atracção electrostática, intercalação dos anéis aromáticos de uma molécula entre os pares de bases do ADN, e ligação covalente de uma molécula em qualquer um dos sulcos do ADN. Os agentes que podem danificar o ADN podem actuar directamente ou necessitar de activação metabólica [17]. Provavelmente, os mecanismos endógenos mais frequentes através dos quais a integridade do ADN está comprometida incluem a desaminação (da citosina ou da guanina para formar uracil ou xantina) e a depurinação [18], **Fig. 1.15** e **Fig. 1.16**. Cada uma das bases alteradas apresenta propriedades de emparelhamento diferentes comparativamente com a base original e conduz a mutações pois não existe maneira de determinar o parceiro correcto para a base modificada [19],[20].

A formação endógena de espécies reactivas de oxigénio (ROS – “reactive oxygen species”) e de outros radicais livres [21], e a exposição exógena a radiação (luz ultravioleta, rádon, raios X), podem danificar o ADN directamente produzindo ligações cruzadas nas cadeias, fragmentação das cadeias, aberrações cromossómicas e outras mudanças estruturais [22]. Uma ampla variedade de bases alteradas podem ser formadas, **Fig. 1.17**, das quais as mais estudadas são: os anéis purínicos abertos, a timina glicol e a 8-oxoguanina, sendo as duas últimas implicadas em mutagénese.

Os processos metabólicos endógenos normais, como a peroxidação lipídica e processos redox cíclicos, podem produzir radicais livres de oxigénio e formar aductos oxidativos no ADN. Os percursos que levam à formação de radicais de oxigénio incluem a degradação de peróxidos orgânicos (catecol, hidroquinona, 4-nitroquinolina-N-óxido), água oxigenada, a peroxidação lipídica, e a catalisação cíclica de algumas enzimas. A exposição a promotores de tumores aumenta indirectamente a formação de radicais livres, como por exemplo a inflamação mediada pelo óxido nítrico. Os radicais livres de oxigénio produzem múltiplos aductos no ADN, incluindo a 8-hidroxi-deoxiguanosina, a timina glicol, 5-hidroxiuracil, 5-hidroxi-metil-uracil, e 6-hidroxi-5,6-dihidrocitidina.

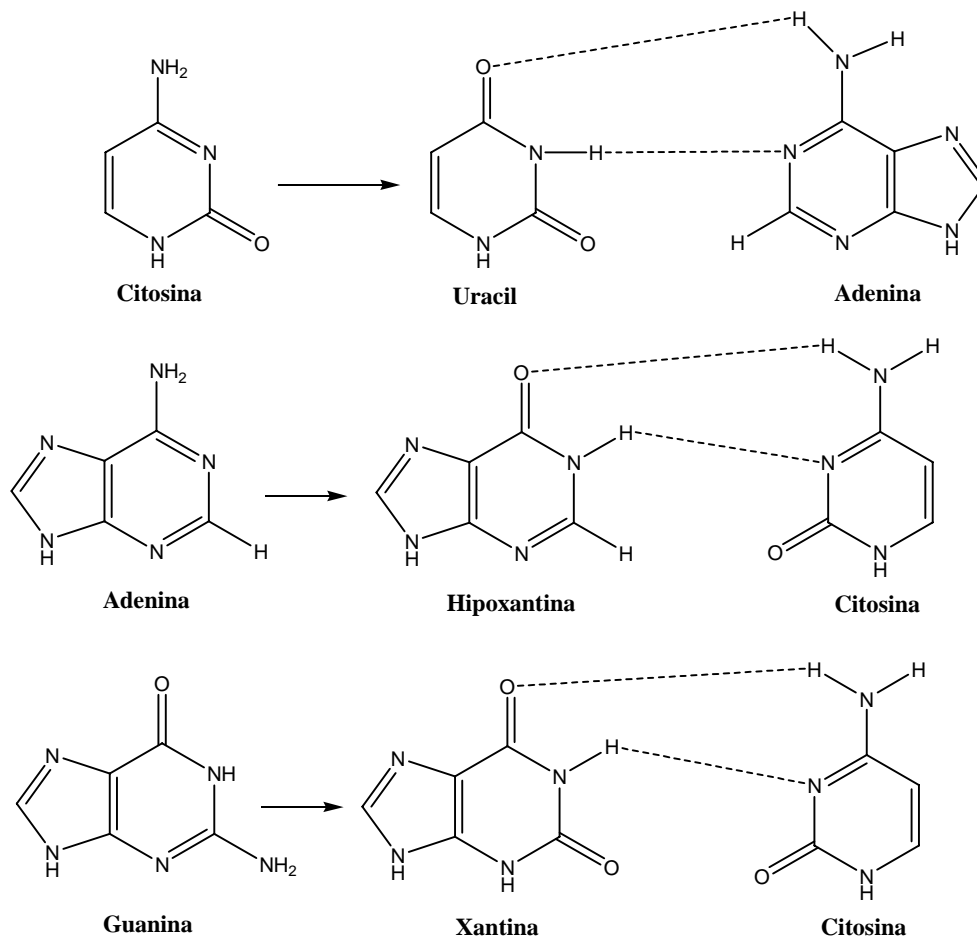


Figura 1.15 – Lesões espontâneas no ADN, resultantes do processo de deaminação e o emparelhamento subsequente.

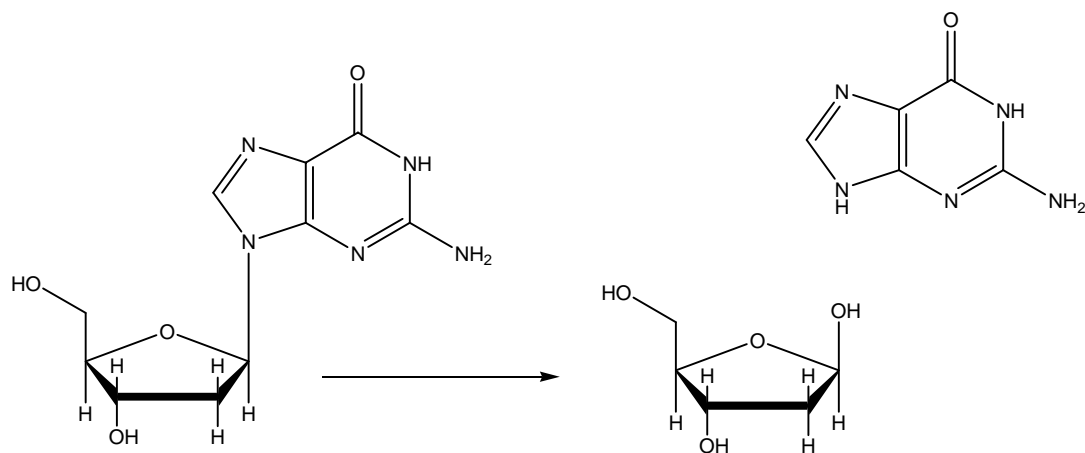


Figura 1.16 – Depurinação da guanósina.

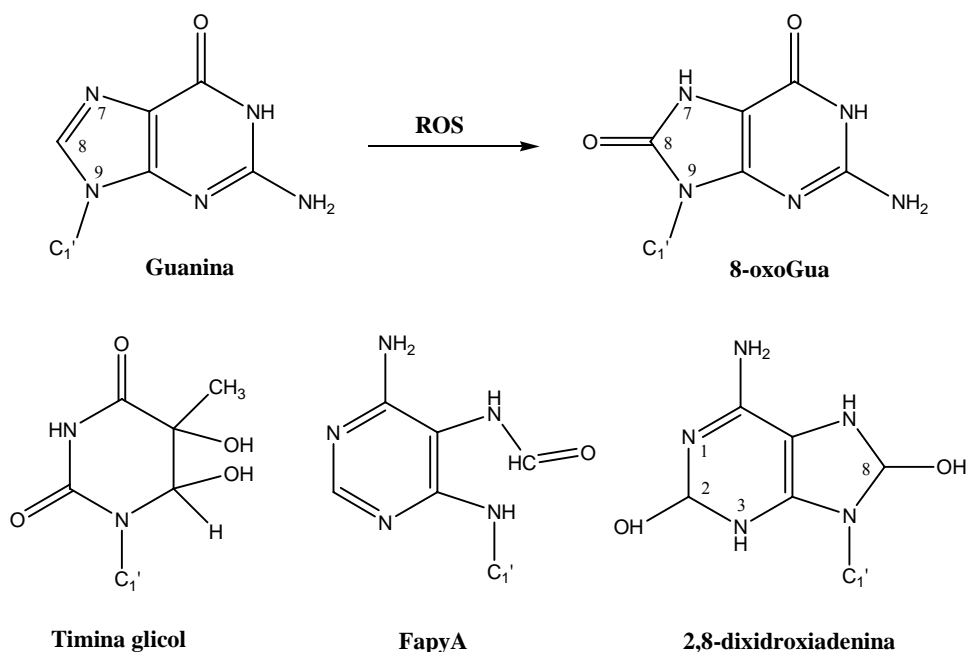


Figura 1.17 – Bases alteradas no ADN.

Os agentes exógenos que prejudicam directamente o ADN são altamente reactivos e incluem o rádon, a luz ultravioleta, as nitrosoureas, algumas nitrosaminas, o óxido de etileno e o ozono. No entanto, a maioria dos cancerígenos químicos exógenos são inertes, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), e requerem a activação metabólica a fim de se tornarem aductos ao ADN. Estes são alterados metabolicamente por enzimas [23], que convertem uma pequena fracção da dose inicial para um metabolito intermediário altamente reactivo que reage directamente com bases específicas nos ácidos nucleicos.

Os exemplos de cancerígenos exógenos variam desde alguns produtos vegetais e fungos (aflatoxinas, ocratoxinas, hidrazinas), a produtos de pirólise (aminas heterocíclicas, HAP), produtos de combustão industrial (aminas aromáticas, HAP, nitro-HAP, benzeno, cloreto de vinilo, nitrosaminas, óxido de etileno), poluentes urbanos (HAP, nitro-HAP, aminas aromáticas), e o conteúdo do fumo de tabaco (HAP, nitrosaminas, aminas aromáticas). Além disso, a formação de radicais livres de oxigénio através de processos redox desnecessários podem ocorrer depois da activação metabólica de uma forma inerte de químicos cancerígenos.

Interação com iões. Os sítios de ligação para iões metálicos oferecidos pelos ácidos nucleicos são os átomos de oxigénio e de nitrogénio. Apenas certos tipos de iões metálicos são capazes de se ligar ao ADN: iões metálicos alcalinos, alcalinos-terrosos e de transição. Os iões podem estabilizar a estrutura terciária do ADN, se ligam aos grupos fosfato das cadeias, mas podem também ter efeitos destabilizadores se interagem com as bases.

Os iões predominantes nas células, K^+ , Na^+ e Mg^{2+} , são atraídos pela carga negativa do esqueleto açúcar-fosfato do ADN (duas cargas por par de bases) e, embora permanecem móveis, têm a tendência para ocupar um volume restrito [15]. Alguns podem ligar-se em locais bem definidos; segmentos de ADN que podem pertencer a uma única cadeia dobrada, formam estruturas nas quais são empilhados quatro ou mais quartetos de guanina, uns sobre os outros. Os iões monovalentes, normalmente K^+ ou Na^+ , encontram-se no centro desta estrutura, embora nem sempre no plano das bases [24],[25]. Devido à presença destes iões positivos as interações dos ácidos nucleicos com grupos de catiões das proteínas são fortemente influenciadas pela força iónica do meio ambiente.

Os catiões orgânicos, predominante as poliaminas [26], competem com os iões simples K^+ e Mg^{2+} . Estudos revelaram que a espermina se liga no sulco maior do B-ADN. A espermina também se liga ao sulco do A-ADN, onde interage por pontes de hidrogénio com as bases na sequência GTG das duas cadeias [27], e nas sequências ricas em CG no sulco menor do Z-ADN, onde estabiliza a estrutura e encurta a hélice [28]. Em altas concentrações de ADN, como acontece nos núcleos da célula, a espermidina induz a conversão do ADN para a fase de cristais líquidos [15].

Os iões de metais pesados e complexos de metais podem encontrar sítios de ligação nos átomos de nitrogénio das bases do ADN. Exemplos são a cisplatina e o antibiótico neocarzinostatina, agente de clivagem do ADN [15]. Os metais podem interagir com os electrões das bases do ADN, mesmo sendo empilhadas. Complexos de ruténio e de ródio, intercalados na estrutura de ADN, conseguiram uma transferência de electrões entre Ru(II) e Rh(III) a mais de 4,0 nm de distância, através das bases empilhadas aparentemente agindo como semicondutores [29],[30].

Agentes intercalantes. Os agentes intercalantes são compostos hidrofóbicos, com estruturas planares que se podem inserir entre os pares de bases no centro da dupla hélice do ADN. A interacção ocorre quer por meio da modificação química, sendo o alvo principal a guanina [31], quer por ligação à dupla hélice do ADN, por intercalação entre bases adjacentes [32], perturbando as ligações de hidrogénio. Estes compostos ocupam espaço na hélice, desenrolando-a e aumentando a distância entre pares de bases sucessivos, destabilizando a estrutura de hélice dupla.

O processo de intercalação foi observado para muitos antibióticos e outros fármacos, tintas e poluentes ambientais. Como estes agentes intercalantes podem ser mutagénicos, a exposição accidental ou certos tratamentos têm reacções e efeitos secundários de curto e longo prazo.

A intercalação de moléculas planas nas cadeias dos ácidos nucleicos pode resultar numa função bioquímica não desejada. Nas proteínas, os anéis aromáticos das cadeias laterais dos aminoácidos são projectados para interagir com os ácidos nucleicos em sítios específicos. As mudanças na densidade da super-hélice, causadas por uma intercalação, podem ser importantes para a manipulação ordenada do ADN por enzimas dentro das células.

Agentes alquilantes. A alquilação do ADN é a reacção dos agentes alquilantes com os centros nucleofílicos, tais como os átomos de oxigénio ou de azoto nas bases ou na espinha dorsal do ADN. O resultado da reacção é a formação de bases de ADN modificadas denominadas aductos, ou formação de fosfotriésteres [20] no caso da interacção com o oxigénio fosfodiéstero na espinha dorsal do ADN. O aducto juntamente com a base oposta é chamado uma lesão.

A primeira prova química dos danos ao ADN produzidos por alquilação foi relatada em 1962 após a detecção *in vivo* de 7-metilguanina como produto da dimetilnitrosamina administrada aos ratos [20]. Desde essa altura, a lista de agentes de alquilação e dos locais de alquilação tem aumentado significativamente, de modo que agora é conhecido que quase todos os átomos de nitrogénio e de oxigénio dos nucleotídeos no ADN podem sofrer modificações.

Um dos mecanismos [20] dos agentes alquilantes implica a atribuição de grupos alquílicos às bases do ADN. Esta alteração resulta na fragmentação do ADN por

enzimas de reparação na tentativa de substituir as bases alquiladas. As bases alquiladas impedem a síntese de ADN e a transcrição do ARN a partir do ADN afectado.

Um segundo mecanismo pelo qual os agentes alquilantes podem causar dano no ADN é a formação de ligações cruzadas no ADN. Neste processo, duas bases estão ligadas entre si por um agente alquilante que possui dois grupos de ligação ao ADN. As pontes podem ser formadas dentro de uma única molécula de ADN ou ligar duas moléculas diferentes de ADN, impedindo assim a separação das cadeias para síntese ou transcrição.

O terceiro mecanismo de acção é a indução do emparelhamento errado das bases alteradas levando a mutações, sendo frequentemente as bases de guanina alquiladas que formam erroneamente pares com a timina (O6metilG-T) [33]. Se o emparelhamento errado não for corrigido, pode levar a uma mutação permanente.

1.2 A electroquímica do ADN

1.2.1 Propriedades electroquímicas do ADN

Os ácidos nucleicos são moléculas electroactivas e, tanto o comportamento electroquímico, como a adsorção dos ácidos nucleicos e dos seus componentes têm sido extensivamente estudados durante as recentes décadas em vários tipos de eléctrodos [34-40].

Provas da condutividade eléctrica do ADN e os seus mecanismos têm sido evidenciadas dando origem a uma teoria de condução de electrões em biopolímeros [41]. Foi demonstrado que a conductividade é electrónica ou iónica, consoante a temperatura da amostra e o teor de água, bem como o facto de que a conductividade das amostras nativas é superior ao das amostras desnaturadas e ocorre através dos pares de bases correctamente formados e empilhados [42]. O estudo do ADN em hélice dupla ou em cadeias simples mostrou propriedades electroquímicas interessantes [43], tornando-se assim necessário analisar e explicar os factores que determinam a afinidade e a selectividade na ligação de moléculas ao ADN.

Os estudos electroquímicos iniciais foram efectuados com eléctrodos gotejantes de mercúrio para o estudo da redução [44] e continuados principalmente com eléctrodos

de carbono para a oxidação do ADN [45], mas estudos esporádicos em eléctrodos de ouro, platina, cobre e prata foram também descritos [46]. Dos componentes do ADN, só as bases sofrem redução [47-49] ou oxidação [50, 51], **Fig. 1.18**, embora tenha sido mostrada recentemente a possibilidade de se observar a oxidação dos resíduos de açúcar utilizando eléctrodos de cobre [46].

A electroquímica dos ácidos nucleicos nos eléctrodos gotejantes de mercúrio mostrou que é possível detectar a redução das bases adenina, citosina e guanina [37, 44, 49], e que a estrutura do ADN (hélice dupla, cadeia simples ou ADN desnaturado) influencia significativamente a redução das mesmas [38].

Nos eléctrodos de carbono (carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono ou diferentes formas de grafite), devido ao intervalo de potencial positivo maior do que no caso dos eléctrodos de mercúrio, todas as bases do ADN podem ser oxidadas [45, 52, 53], **Fig. 1.19**, seguindo um mecanismo pH-dependente [50, 51].

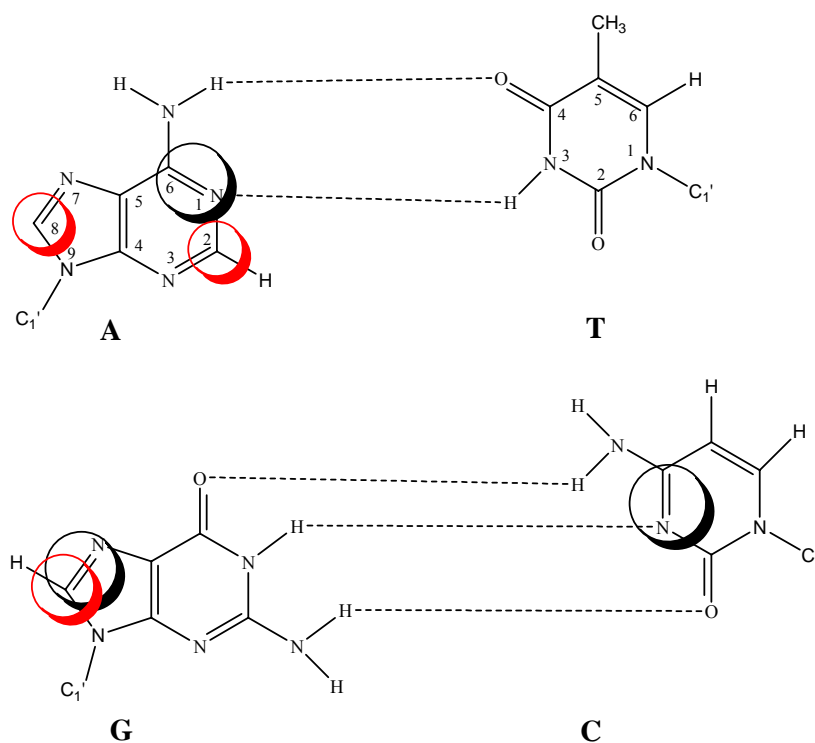


Figura 1.18– Emparelhamento de bases Watson-Crick: **O** - sítios de redução da adenina (A), citosina (C) e guanina (G); **○** - sítios de oxidação da A e G. Adaptado de [54].

A oxidação electroquímica do ADN num eléctrodo de carbono vítreo, **Fig. 1.19**, mostra que as purinas, guanina e adenina, são oxidadas a potenciais positivos inferiores aos das pirimidinas, citosina e timina, que sofrem oxidação a potenciais positivos muito altos, perto do potencial que corresponde à evolução do oxigénio, sendo mais difícil de detectar. As correntes de oxidação, obtidas por voltametria de impulso diferencial, podem ser usadas como sondas individuais dos pares de bases AT e GC na dupla hélice do ADN. Também foi observado que, para as mesmas concentrações, as correntes de oxidação das bases pirimidínicas são menores em relação às correntes das bases purínicas [51].

Diferenças nos sinais registados para o ADN nativo, **Fig. 1.20**, evidenciaram a maior dificuldade para a passagem dos electrões, do interior da sua forma mais rígida de dupla hélice para a superfície do eléctrodo, comparativamente com os sinais obtidos para o ADN de cadeias simples, mais flexível, onde os resíduos de guanina e adenina se encontram nas proximidades da superfície do eléctrodo [36, 43].

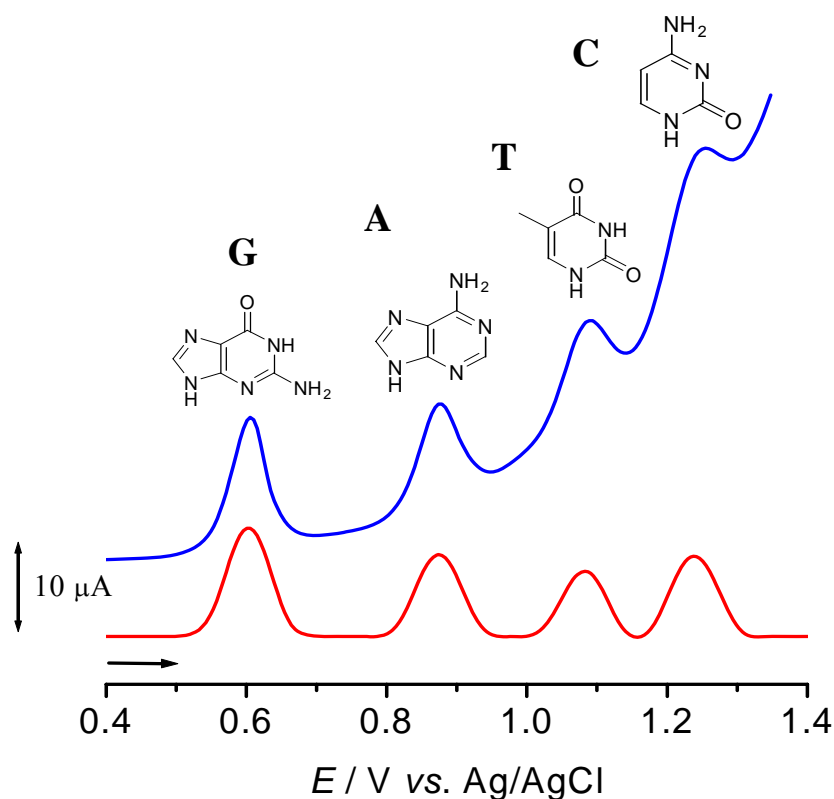


Figura 1.19– Voltamogramas de impulso diferencial obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo, mostrando a oxidação das quatro bases do ADN [55].

A mais frequente base alterada no ADN, a 8-oxoguanina (8-oxoGua), é formada pela oxidação da guanina no C8 [56]. A presença da 8-oxoGua leva à codificação errada da base adenina durante a síntese do ADN. A actividade correcional das ADN-polimerases não consegue remover a adenina quando esta está incorporada no lado oposto de 8-oxodGua, sendo as mutações principalmente de tipo G → T [57].

Estudos recentes têm sugerido que outras lesões poderiam ser tão importantes como a 8-oxoGua [58-60]. A oxidação da adenina leva à formação de 2-hidroxiadenina ou de 8-hidroxiadenina [61], produtos encontrados com actividade mutagénica [31]. Além disso, cada um destes produtos também podem sofrer uma oxidação irreversível a 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) [61]. Embora a sua formação no ADN não seja tão eficiente como a formação da 2- ou 8-hidroxiadenina, a incorporação do 2,8-dihidroxi-desoxiadenosina monofosfato parece ser o principal caminho para a formação da 2,8-DHA no ADN. A presença da 2,8-DHA no ADN pode induzir mutações de tipo transversões A → C e T, e uma transição de A para G [59]. Estes tipos de bases modificadas do ADN foram encontrados em tecido humano canceroso [58].

Por voltametria de impulso diferencial é possível identificar a presença dos produtos de oxidação, 8-oxoGua [62, 63] e/ou 2,8-DHA [64] no ADN, **Fig. 1.20**, após a sua oxidação prolongada. Isto indica que é possível detectar simultaneamente num único ensaio voltamétrico se o ADN se encontra em cadeia simples ou dupla e se sofreu danos oxidativos. Em consequência, o estudo da electrooxidação do ADN em eléctrodos de carbono está baseado na monitorização de variações nas correntes das bases purínicas ou na detecção dos seus produtos de oxidação principais, 8-oxoGua [62, 63] e/ou 2,8-DHA [36, 64], considerados marcadores biológicos de dano oxidativo [9, 36].

Como constituintes do ADN, a adenina e a guanina estão envolvidas na transdução de energia e na sinalização celular mediada por reacções de oxidação enzimática. Os processos electroquímicos envolvidos na oxidação das purinas do ADN são semelhantes aos processos enzimáticos envolvendo reacções de oxidação [65] e são de uma importância crucial para melhorar a interpretação das interacções do ADN com fármacos ou metais que levam ao dano oxidativo hereditário [36]. Assim, foram propostos mecanismos para a electrooxidação da guanina e da adenina [61, 66], **Fig. 1.21**.

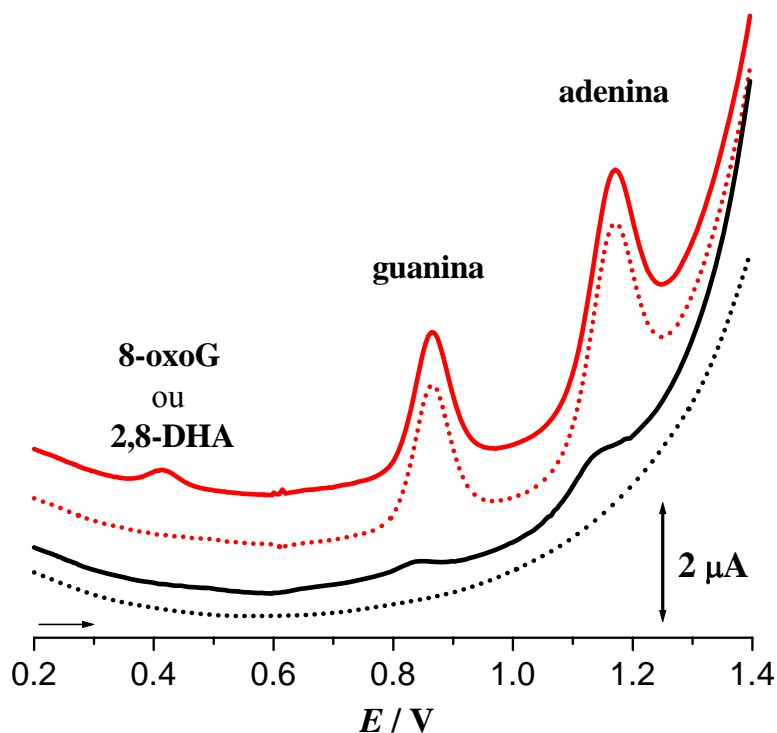


Figura 1.20 – Voltamogramas de impulso diferencial obtidos com o eléctrodo de carbono vítreo em soluções tampão acetato 0,1 M pH 4,5 com: 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ssDNA (••••) 1º e (—) 10º varrimento, e 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA (••••) 1º e (—) 40º varrimento de potencial.

A oxidação electroquímica da guanina num eléctrodo de carbono vítreo [63] ocorre em duas etapas consecutivas, com a formação da 8-oxoGua no primeiro passo, num processo irreversível que envolve a perda de 2 electrões e de 2 protões. A segunda etapa corresponde a uma oxidação reversível da própria 8-oxoGua [62, 63] e a formação de dímeros [67] ou de vários outros produtos, dependente do pH do meio utilizado: a ureia, 2-amino-4,5,6-trioxipirimidina, 5-guanidinohidantoina, ou mesmo FAPy-dG [68, 69].

A oxidação da adenina é um processo irreversível que envolve a perda de 2 electrões e de 2 protões [63] com a formação de produtos intermediários, 2-hidroxiadenina ou 8-hidroxiadenina, **Fig. 1.21B**. Na literatura existe alguma controvérsia [70, 71] sobre os passos seguidos durante a oxidação, tal como sobre os produtos intermediários e finais, no entanto estudos cinéticos desta reacção mostraram que nenhum dos intermediários poderá ser excluído. Em seguida, qualquer um destes produtos intermediários pode sofrer oxidação, com a transferência de 2 electrões e de 2 protões, levando à formação da 2,8-DHA.

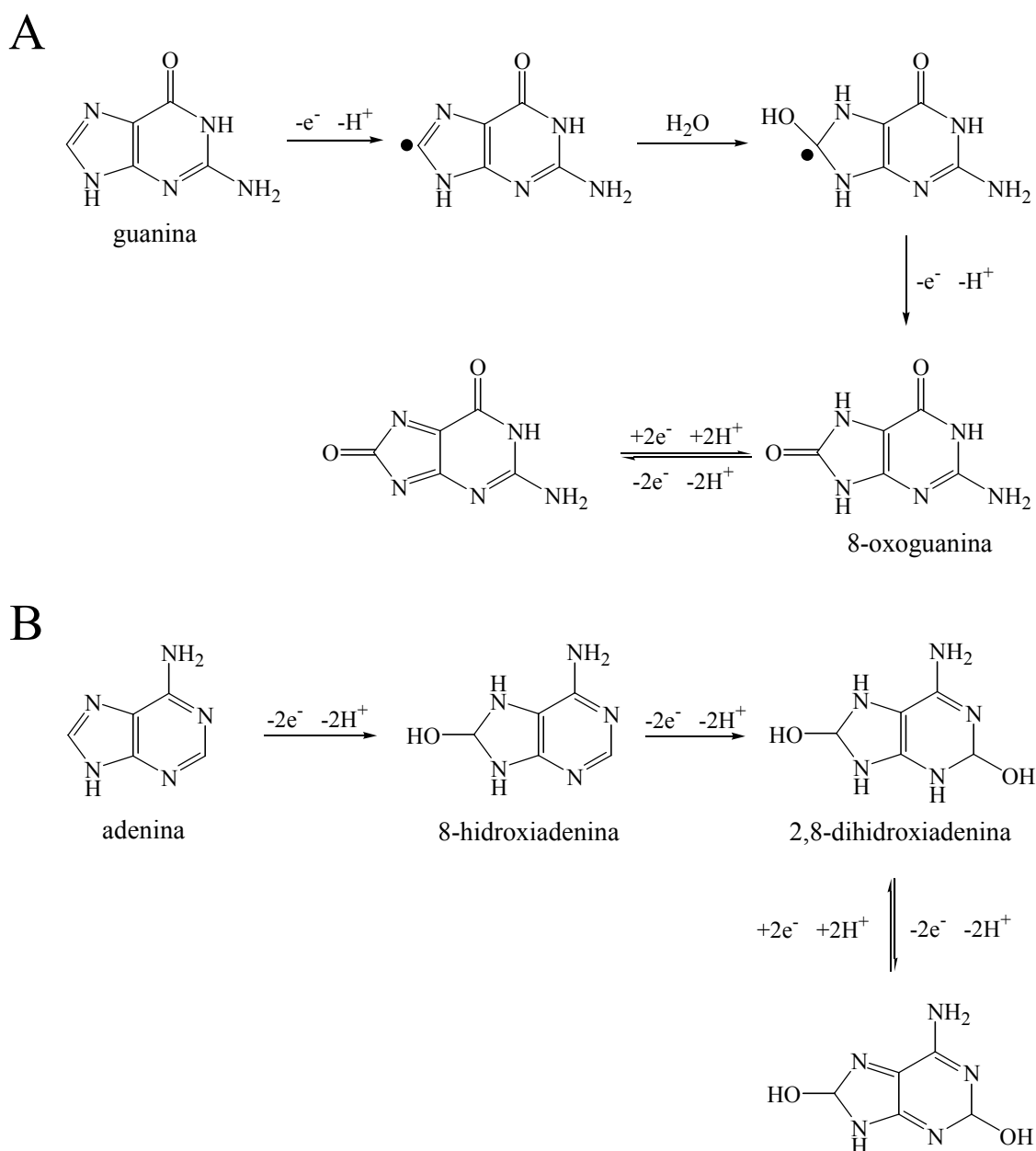


Figura 1.21 - Mecanismos de oxidação da **A**) guanina e **B**) adenina. Adaptado de [61, 66].

O estudo electroquímico deste principal produto mutagénico, resultado da oxidação *in vivo* da adenina, mostra que a 2,8-DHA sofre oxidação e redução na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo [64], em processos independentes. A oxidação de 2,8-DHA ocorre numa única etapa com a transferência de 2 eléctrons, conduzindo à formação de um produto também electroactivo. O processo de oxidação pode ainda levar à formação de dímeros de 2,8-DHA, bem documentados na literatura

[63, 72, 73], mas com uma vida útil curta [64]. A redução de 2,8-DHA é um processo que se torna reversível na ausência de oxigénio molecular. A presença do oxigénio não só torna o processo de redução da 2,8-DHA irreversível, mas também o dificulta.

Embora a grande maioria das mutações observadas em tumores humanos sejam grandes inserções, deleções e rearranjos, a maioria dos testes de genotoxicidade e mutagénese e as informações acerca de carcinógenos químicos centram-se na sua capacidade de causar mutações pontuais, especialmente nos eventos de transição e de transversão de um único par bases no ADN. As técnicas electroquímicas, devido à grande sensibilidade e tempos de ensaio na ordem de segundos, tornam-se importantes para o desenvolvimento de diagnósticos clínicos baseados na detecção destas modificações pontuais para o estudo do mecanismo da interacção específica do ADN com agentes cancerígenos.

Vários métodos têm sido utilizados para estudar os ácidos nucleicos; métodos coulométricos, espectrofotométricos e utilizando técnicas de separação como a cromatografia, através dos quais foi possível determinar e caracterizar os produtos de oxidação de algumas das bases, dos nucleosídeos e dos nucleotídeos de ADN.

O uso de técnicas electroquímicas em conjunto com novos materiais de eléctrodo, como o carbono vítreo, pasta de carbono ou grafite pirolítica altamente orientada, possibilitou o desenvolvimento de novos métodos voltamétricos e potenciométricos com maior sensibilidade, assim como os eléctrodos modificados com ADN e biossensores com ADN. Estes tipos de eléctrodos modificados permitem o estudo do mecanismo de interacção do ADN com metais, fármacos e poluentes, e consequentemente, uma vasta gama de aplicações analíticas e biotecnológicas podem ser desenvolvidas.

1.2.2 Biossensores electroquímicos com ADN

Quando as moléculas de ADN nativo ou sintético interagem com a superfície de um eléctrodo ocorre um processo de adsorção. O conhecimento sobre a adsorção de ácidos nucleicos sobre o eléctrodo conduziu ao desenvolvimento de eléctrodos modificados com ADN, também chamados biossensores electroquímicos com ADN [35, 37, 39, 40, 74-78]. Os biossensores electroquímicos com ADN constituem um bom

modelo para simular as interações dos ácidos nucleicos com a membrana celular, com potenciais compostos carcinogénicos ambientais e para clarificar os mecanismos de interacção com fármacos e agentes quimioterapêuticos.

O estudo da adsorção do ADN nas superfícies de eléctrodo é de interesse fundamental, uma vez que a interacção do ADN com superfícies carregadas ocorre em sistemas biológicos. Estudos de adsorção do ADN foram realizados em eléctrodos mercúrio [79-86] e de carbono [36, 87], sendo igualmente necessária a caracterização morfológica da adsorção na superfície dos eléctrodos [88-93] para o desenvolvimento de metodologias aplicadas ao estudo da interacção de várias moléculas com ADN.

Um biosensor electroquímico com ADN é um dispositivo receptor-transdutor integrado, que utiliza o ADN como o elemento de reconhecimento biomolecular (a sonda), imobilizado directamente sobre o transdutor electroquímico, o eléctrodo, para detectar processos de interacção específica [94, 95]. A interacção entre o ADN e diferentes agentes químicos é detectada através das alterações que ocorrem na camada de ADN imobilizada na superfície do eléctrodo, e o desempenho, a sensibilidade e a reprodutibilidade na resposta electroquímica são ditados pelo procedimento de imobilização do ADN.

As propriedades biofísicas do ADN, como a flexibilidade, e as as interações com várias moléculas, são influenciadas pela estrutura do ADN adsorvido na superfície (ssDNA ou dsDNA), a concentração, o pH e o electrólito de suporte [88, 90, 93, 96]. Por isso, uma plena compreensão da morfologia da superfície do biossensor electroquímico com ADN é necessária para garantir a interpretação correcta dos resultados experimentais. Para caracterizar a morfologia de adsorção na superfície dos eléctrodos, o grau de cobertura da superfície e a estabilidade do filme de ADN, tanto como as conformações que o ADN pode adoptar durante o processo de imobilização, foi utilizada a microscopia de força atómica (AFM) [88-90, 93, 96, 97].

Os eléctrodos de carbono, como o carbono vítreo, fibras de carbono, ou grafite, têm uma larga aplicação electroquímica, mas não representam um bom substrato para obter imagens AFM devido a rugosidade. Assim, utilizando a grafite pirolítica altamente orientada (HOPG), foi possível visualizar directamente as características da superfície coberta por filmes de ADN.

A superfície do HOPG é extremamente lisa e permitiu a identificação das alterações topográficas após a modificação da sua superfície com filmes de ADN de várias espessuras [88, 90, 91, 96], **Fig. 1.22**, evidenciando que a metodologia de imobilização conduz a diferenças estruturais no filme molecular e consequentemente às diferenças na resposta do sensor electroquímico.

Um filme fino de ADN adsorvido na superfície do HOPG encontra-se numa estrutura de rede, com poros que deixam à vista partes da superfície do eléctrodo, enquanto que um filme espesso de ADN cobre completamente o eléctrodo com uma multicamada uniforme e apresenta uma estrutura mais rugosa. A rede formada no eléctrodo pela adsorção do filme fino de ADN separa diferentes áreas activas da superfície que podem assim actuar como um sistema de micro- e nano-eléctrodos, no entanto permitindo a difusão de moléculas a partir da solução e a adsorção não específica das mesmas na superfície.

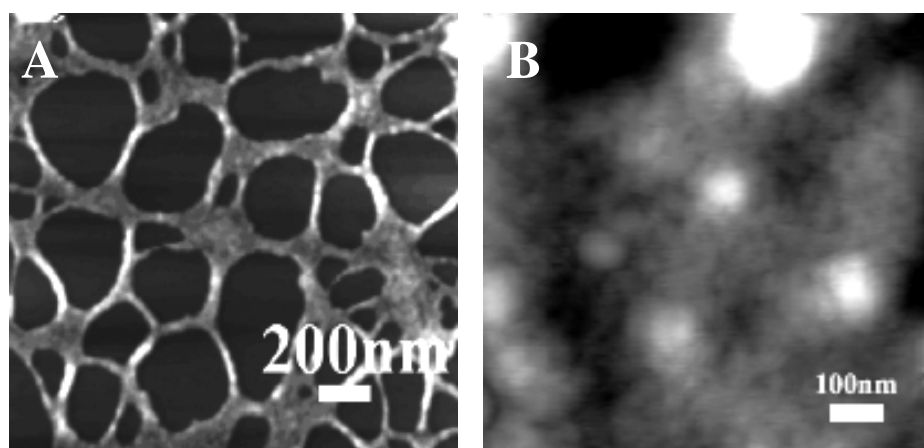


Figura 1.22 – Imagens topográficas de dsDNA obtidas em ar com o modo MAC de AFM. **A)** filme fino de dsDNA obtido aplicando um potencial de + 0,30 V vs. AgQRE durante 3 min. numa solução de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA; **B)** filme espesso de dsDNA preparado por evaporação a partir de uma solução de $37,5 \text{ mg ml}^{-1}$ [90].

Para o estudo da interacção de vários compostos com o ADN é preciso evitar a adsorção não específica, que conduz à dificuldade em discriminar entre o sinal electroquímico proveniente do ADN modificado pela interacção e o sinal da molécula

adsorvida directamente na superfície do eléctrodo [98]. Uma cobertura completa da superfície do eléctrodo, como no caso do filme multicamada de ADN, garante que a contribuição no sinal electroquímico é devida apenas ao ADN modificado pela interacção com a molécula de interesse.

Na construção de biossensores electroquímicos com ADN geralmente são utilizados diferentes tipos de eléctrodos de carbono, como carbono vítreo ou pasta de carbono, mas verifica-se que a interacção, a adsorção e o grau de cobertura da superfície por ADN destes eléctrodos são semelhantes com o HOPG. Como o ADN é um poli-anião, a adsorção na superfície de um eléctrodo é condicionada pela carga deste, ou seja, pelo potencial aplicado, **Fig. 1.23**. Verificou-se experimentalmente que o ADN adsorve reversivelmente á superfície de um eléctrodo carregado positivamente e pode sofrer transições conformacionais consoante o potencial aplicado [36, 43, 99].

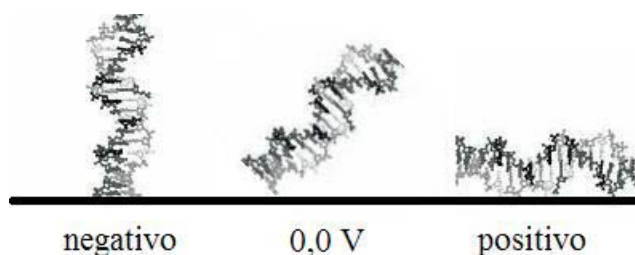


Figura 1.23 – Orientação de uma dupla hélice de ADN na superfície de um eléctrodo consoante o potencial aplicado.

Num eléctrodo de carbono vítreo operando num intervalo de potencial positivo, o ADN está adsorvido de forma que o eixo maior da hélice encontra-se orientado numa posição paralela à superfície do eléctrodo. Os pares de bases estão orientados perpendicularmente à superfície do eléctrodo assim que a espessura de uma monocamada de ADN em hélice dupla é de cerca 2 nm [81, 100]. A possibilidade de controlar a cobertura da superfície do eléctrodo e de seleccionar a orientação do ADN, através de pequenas variações no potencial aplicado, abre novas perspectivas para o desenvolvimento e aplicações de biossensores electroquímicos com ADN.

A transdução electroquímica, quando comparada com outros transdutores ópticos ou piezoelétricos, tem a vantagem de ser rápida, sensível e de custo baixo. O eléctrodo é tanto um reagente com carga eléctrica que modula a intensidade do fenómeno adsorptivo, como um detector de todos os fenómenos que ocorrem na sua superfície. É também necessário que o analito seja electroactivo, capaz de sofrer reacções de transferência electrónica a fim de se utilizar um transdutor electroquímico. A vantagem mais importante de utilizar biossensores electroquímicos com ADN é a possibilidade da geração *in situ* de radicais intermediários reactivos e a detecção da interacção dos mesmos com o ADN.

O desenvolvimento de biossensores electroquímicos com ADN abriu uma larga perspectiva das aplicações que precisam meios particularmente sensíveis e selectivos para a detecção de interacções prejudiciais específicas no ADN: monitorização directa do processo de hibridização em protocolos de sequenciação ou de identificação de uma sequência de genes específicos em ácidos nucleicos de proveniência humana, bacterial ou viral, estudo fundamental da interacção de inúmeras substâncias com o ADN, detecção e quantificação dos danos oxidativos, diagnósticos clínicos e laboratoriais, e também monitorização de poluentes e metais no ambiente, e de organismos patogénicos nos alimentos [36, 37, 39, 54, 75, 76, 78]. Neste contexto, um biossensor electroquímico com ADN foi utilizado no presente trabalho para investigar e detectar o possível dano causado ao ADN pela acção de novos fármacos desenvolvidos para o tratamento de estados neoplásicos.

1.3 Paládio

O paládio pertence ao grupo VIII na tabela periódica, o grupo dos metais de platina (“Platinum Group Metals”- PGM), é um metal branco prateado com número atómico 46, peso atómico 106 e símbolo químico Pd. O grupo dos PGM é dividido em dois subgrupos, elementos “leves” e “pesados”, onde o Pd pertence ao subgrupo de PGM leves junto ao irídio, ósmio, platina, ródio e rutenio. Estes metais também são designados por metais “nobres” devido à resistência à corrosão. O grupo tem propriedades catalíticas excelentes o que conduziu ao seu uso em autocatalizadores [101].

O paládio é relativamente inerte no seu estado elementar, com a menor densidade e o menor ponto de fusão dos elementos do grupo, sendo mais plástico que a platina. Quando temperado, o paládio é macio e dúctil. À temperatura ambiente o metal tem a propriedade incomum de absorver até 900 vezes o seu próprio volume de hidrogénio [102]. O hidrogénio difunde rapidamente no paládio aquecido o que oferece meios de purificação do gás [103].

1.3.1 Breve nota historica

O paládio tem uma história ligada à platina, junto com a qual é encontrado na "platina nativa", minério no estado natural que contém uma mistura de metais do grupo de platina, assim que a sua história é compartilhada.

Rastos de platina foram encontrados entre os artefactos do Egipto antigo, mas é incerto que a platina era reconhecida como metal pelas primeiras civilizações. O melhor exemplo conhecido é uma fita pequena de platina nativa na superfície de uma caixa entre muitas inscrições hieroglíficas, datada do Séc. VII AC, de Teba. Tinha sido trabalhada na mesma maneira que os artesãos de Teba trataram a prata, e é provável que tenha sido considerada como tal, por engano.

A primeira exploração próspera de platina foi desenvolvida nas Americas, pelo povo nativo de Esmeraldas na região litoral do norte do Equador, muitos séculos antes da conquista espanhola. Foram encontrados pedaços pequenos de jóias, anéis, pendentos, entre outros, executados em platina, ou em platina e ouro combinados, através de uma técnica de metalurgia de pó – sinterização na presença de uma fase líquida, exibindo uma habilidade metalúrgica significativa e sofisticada. A datação pelo carbono radioactivo estabeleceu a data destes artefactos entre o Séc. I e IV DC.

Só depois da conquista espanhola do Mundo Novo, durante os Séc. V e VI, chegam à Europa notícias de um novo metal branco com propriedades incomuns. Na realidade, a platina nativa era considerada de pouco valor, como produto não-desejado resultado das actividades mineiras do ouro. Os espanhóis chamaram este metal branco platina, um diminutivo derogatório de *plata*, a palavra para prata. Em breve, a platina chegou a ser utilizada por falsificadores para adulterar as moedas espanholas de ouro.

Os cientistas europeus chegaram a mostrar algum interesse quando notaram as propriedades extraordinárias do metal: a platina não derretia no fogo, pesava mais do que o ouro e era virtualmente impossível de ser corroída com gases ou substâncias químicas. Em 1751 foi reconhecida como um elemento novo [104].

Seguindo com a perfeição da técnica para obter amostras puras de platina, em 1803 William Hyde Wollaston conseguiu isolar o paládio da platina dissolvendo o minério em *aqua regia* [105]. O processo consiste ainda na neutralização dos ácidos com hidróxido de sódio e a precipitação da platina como cloroplatinato de amónio, através do tratamento com o cloreto de amónio. O paládio foi então separado como cianeto de paládio através do tratamento com o cianeto de mercúrio. Aquecendo o cianeto, resultou um novo metal branco que recebeu o nome de paládio, como a Pallas, a antiga deusa grega da sabedoria cujo nome também tinha sido emprestado em 1802 ao segundo asteróide descoberto.

Em 1820 Humphrey Davy foi o primeiro a observar o processo de oxidação catalítica, descrevendo-o como um principio "perfeitamente novo em combustão." No entanto, foi o cientista alemão Johann Wolfgang Döbereiner que continuou a experimentação para entender completamente o processo, e verificou que os metais do grupo da platina em pó têm o poder de combinar o oxigénio e o hidrogénio até mesmo a temperaturas baixas.

Nos anos de 1830 foram descobertas várias propriedades do grupo de metais da platina. As experiências de Michael Faraday em electroquímica levaram à descoberta de outras utilizações deste grupo de metais. Faraday usou frequentemente placas de platina como eléctrodos pela sua resistência à reacção com os outros elementos envolvidos, e inventou os termos utilizados hoje em electroquímica: ánodo, cátodo, electrólise e electrólito. William R. Grove, químico e advogado, desenvolveu a primeira pilha de combustível baseada nas propriedades catalíticas da platina, mas foi o químico sueco Joens J. Berzelius que continuou a investigar as propriedades catalíticas do grupo de metais da platina e inventou o termo "catálise". Em 1832, o químico inglês e astrónomo Sir John Herschel fez uma descoberta notável com a platina relativamente ao efeito da luz em certas reacções químicas, numa descoberta que colocou o seu nome entre os inventores da fotografia.

Uma das propriedades mais importantes do paládio foi descoberta como resultado das investigações do químico Thomas Graham. Em 1854, ao investigar como a platina incandescente absorve hidrogénio, descobriu que esta o poderia fazer assim por um período indefinido de tempo, enquanto nenhum outro gás produziu este efeito notável. Com o paládio, ele descobriu que o metal pode absorver 5-600 vezes o próprio volume em hidrogénio. Quando exposto a gás de carvão, só o hidrogénio passou através do paládio. Em 1869, T. Graham teve vários medalhões feitos no que ele acreditou de ser uma liga de paládio e hidrogénio que ele chama *hidrogenium*. Foi só em 1931 que uma companhia alemã, Heraeus, desenvolveu e patenteou ligas de paládio com prata e ouro. Este tipo de ligas são materiais excelentes em odontologia e nos dias hoje ainda são usados em pontes e coroas dentárias.

O uso extensivo de paládio começou nos anos de 1970, devido à introdução de padrões para as emissões dos automóveis e aumentou a procura para conversores catalíticos, nos quais as propriedades notáveis do paládio têm um papel fundamental. Como estes padrões foram legislados e aplicados globalmente nos anos de 1990, a procura para o paládio aumentou exponencialmente .

O paládio ocorre na crosta terrestre com uma abundância relativa de 0,0006 ppm e as fontes de produção de paládio estão bastante limitadas [101]. Mais de 80% da produção de paládio mundial está concentrada em dois países apenas: a Federação Russa e a África do Sul. A Federação Russa conta com quase metade da provisão total de paládio. O paládio também é minado em depósitos menores nos Estados Unidos e Canadá.

Hoje, a maior procura mundial para o paládio vem da indústria automóvel [101], mas como catalizador o paládio tem várias outras aplicações na indústria: no desenvolvimento de pilhas de combustível, nas etapas de produção de fibras sintéticas, poliéster e borracha, na refinação do petróleo e no tratamento das águas. Outras aplicações importantes são no desenvolvimento de dispositivos electrónicos e na purificação do hidrogénio, como membrana fina, onde o paládio permite ao hidrogénio permear pela membrana, mas bloqueia todos os outros gases. Além das suas aplicações industriais, o paládio é também utilizado na fabricação de jóias e nas impressões fotográficas de alta qualidade. No que respeita às aplicações médicas, a utilização

principal é na odontologia, mas recentemente o paládio tem sido utilizado no tratamento do cancro, como fonte radioactiva nos tumores malignos, e no desenvolvimento de novas drogas quimioterapêuticas.

1.3.2 Paládio nos sistemas biológicos

Os metais são encontrados em todo o meio ambiente, e embora determinados metais sejam altamente tóxicos, outros são essenciais para os sistemas vivos, sendo exigidos para reacções enzimáticas ou outros processos fisiológicos. A base da interacção dos metais tóxicos com os componentes celulares envolve a coordenação com ligandos biológicos e o transporte não específico destes metais, que interfere com o transporte dos metais essenciais. Os estudos epidemiológicos mostraram que a exposição ocupacional e ambiental a alguns metais está associada com o risco aumentado de vários cancros e de efeitos adversos para a saúde [106].

Existem vários mecanismos para o transporte de metais tóxicos na célula; a maioria deles envolvem o mimetismo molecular no qual o metal tóxico, directamente ou como complexo, é similar a um composto endógeno. O transporte ocorre devido a baixa selectividade dos transportadores de compostos endógenos, permitindo também o transporte de metais tóxicos na célula.

Por muito tempo o paládio não suscitou grande interesse por parte dos toxicólogos. Sendo um elemento que pertence ao grupo de metais nobres, o paládio foi considerado ter uma relevância toxicológica secundária. Durante mais de cem anos, o paládio tinha sido produzido em quantidades limitadas, mas desde os anos de 1970 a procura de paládio para várias aplicações aumentou notavelmente e conduziu ao aumento das concentrações de paládio no meio ambiente geral [107-109].

Considerando o uso extenso e diverso do paládio, as possibilidades de exposição por todas as rotas (inalação, dermal e oral) aumentaram para a população general e profissional e conduziram a um interesse crescente no perfil toxicológico do paládio nos seus estados mais comuns: Pd(0), Pd²⁺ e Pd⁴⁺. Um dos primeiros relatórios sobre a possível acção do paládio como agente nocivo foi publicado nos anos de 1950 e refere-se a um caso de dermatite de contacto por um anel [110].

Partículas finas de paládio elementar, quase insolúveis em água destilada, dissolvem-se apreciavelmente em condições fisiológicas (sangue, suco gástrico, compostos biogénicos), aumentando a sua bio-disponibilidade [111]. Por exemplo, soluções aquosas de aminoácidos ou peptídeos aumentaram a solubilidade de pó de paládio por um factor de 100 quando comparado com a água pura. Além disso, a presença de certos agentes de complexação (EDTA, substâncias húmicas, bilis) aumentou a solubilidade do paládio em componentes lipídicos [112].

O paládio e seus compostos, se ingeridos, mostraram uma toxicidade aguda de nível baixo a moderado, dependendo principalmente da solubilidade dos mesmos. O risco de toxicidade do paládio, a partir de alimentos ou água contaminados, é baixo para a população geral, mas um estudo conduzido no Reino Unido [113] revelou uma exposição diária através da água potável de 0,03 µg paládio/pessoa/dia, e um conteúdo dietético diário total de até 2 µg paládio/pessoa/dia. A presença de próteses dentárias de/com paládio leva a uma exposição adicional e a concentração de paládio na saliva pode chegar até 10 µg paládio /L. No ar ambiental a concentração de paládio encontrada é geralmente em torno de pg/m³, e conseqüentemente não é considerado que cause problemas de saúde sérios para a população geral, mas efeitos da sensibilização, devido à exposição ocupacional, tais como a asma brônquica, foram relatados. O contacto da pele ou das mucosas com jóias e massas dentárias pode ser uma rota importante de exposição, com sintomas que incluem inchamento, estomatite, o planus oral do líquene, comichão, vertigem, asma e urticária crónica. No entanto, deve realçar-se que o uso de ¹⁰³Pd como fonte radioactiva implantada directamente em tumores malignos não conduziu às complicações relacionadas com a toxicidade do paládio [114].

Embora nenhuns dados estejam disponíveis sobre a carcinogenicidade humana e a toxicidade reprodutiva do paládio [113], estudos *in vitro* mostraram que o Pd²⁺ é um inibidor poderoso interferindo com a actividade de um grupo diverso de enzimas metabólicas importantes, tais como a creatina quinase, aldolase, desidrogenase succínica, anidrose carbónica e fosfatase alcalina, e que interfere igualmente com a síntese de macromoléculas do tecido conexivo, o colagénio [115] e os proteoglicanos sulfatados [116].

No que respeita as interacções metal-ADN, os iões dos metais de transição e de pós-transição [7, 117-121] podem interagir especificamente com a cadeia dupla do ADN e induzir uma destabilização parcial da conformação B-ADN e uma redução no número de bases empilhadas e emparelhadas. O ADN tem quatro locais potenciais para ligar iões de metal: os átomos de oxigénio dos grupos de fosfato negativamente carregados, os hidróxilos da ribose, os átomos de nitrogénio das bases e os grupos ceto exocíclicos das bases [7, 119]. A capacidade destes iões de metal em destabilizar a hélice do ADN é devida a uma afinidade elevada para formar ligações covalentes com mais de dois locais diferentes [7, 119, 122]. Os locais mais reactivos das bases são os N7 da guanina e da adenina, o N3 da citidina e o oxigénio dos grupos carbonil [7, 117-119].

Vários compostos de paládio foram encontrados para interagir *in vitro* com o ADN isolado e a interacção pode induzir mudanças conformacionais na estrutura do ADN [123]. Testes de mutagenicidade efectuados [124, 125] deram resultados negativos, com a excepção do dicarbonato de tetraamino paládio $[Pd(NH_3)_4](HCO_3)_2$, que é utilizado como um intermediário na produção de catalisadores para automóveis [126]. Resultados recentes mostram que o paládio induz mudanças conformacionais nos nucleosídeos, acopladas com ligação ao N7, e possivelmente ao N1, da guanina. Foi também descrita uma perturbação significativa do anel da timina e dos grupos fosfodioxido do ADN, junto com a desnaturação completa da estrutura secundária de B-ADN [117, 127].

Devido ao uso de certos compostos com Pt e a efectividade deles na terapia de cancro, diferentes substâncias com Pd também foram testadas em relação à genotoxicidade das mesmas. Para objectivos quimioterapêuticos, compostos de Pt com a estrutura cis- PtN_2X_2 são geralmente usados, sendo fortes mutagénicos [125], enquanto a mutagenicidade da trans-platina é consideravelmente mais baixa [128].

A genotoxicidade da platina é conhecida por ser determinada pela valência, conformação e estrutura [129]. Os compostos de coordenação planar na forma cis- são os mais potentes genotóxicos entre os compostos de platina. Além disso, há indícios de que a genotoxicidade dos compostos de Pt(IV) surge da redução a espécies divalentes de platina. A replicação do ADN e a divisão celular são inibidas pela formação de

aductos ao ADN por complexos de Pt(II), mas apesar do grande conhecimento sobre a genotoxicidade da platina, pouco se sabe sobre a potencial genotoxicidade dos compostos de paládio.

Vários sais divalentes de paládio foram testados em relação à genotoxicidade, entre estes cis-complexos divalentes, e não mostraram qualquer evidência de mutagenicidade em células bacterianas e mamíferas [129]. Os compostos de paládio PdCl_2 , K_2PdCl_4 , $\text{cis-Pd}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2$, $\text{cis-Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ e os compostos correspondentes trans-Pd também não mostraram qualquer genotoxicidade em linfócitos humanos. Como o raio atômico do Pd é menor do que o da Pt, um cis-complexo divalente de Pd vai dissociar-se mais rapidamente em solução para Pd^{2+} e os respectivos ligandos. Este pode ser o motivo pelo qual nenhum dos compostos de paládio testados até agora se apresenta como mutagênico, em contraste com os efeitos bem conhecidos dos cis-complexos de platina [130]. Em geral, os compostos de Pt e Rh mostram fortes efeitos genotóxicos (provavelmente mediado também pelo dano oxidativo induzido ao ADN) comparando com os sais de Pd [131].

No entanto, efeitos genotóxicos de partículas de Pd com um tamanho de 0,25 a 0,5 μm , foram recentemente investigados utilizando culturas de células mamíferas [130]. Estas experiências demonstraram uma indução de aductos ao ADN dependente da dose, após a exposição das células epiteliais alveolares a partículas de Pd. Esta foi a primeira prova de que as partículas de PGM podem ser absorvidas por fagocitose, entrar no núcleo e ligar ao ADN. Sendo que 11 a 36 % das partículas emitidas pelos catalisadores de automóveis têm um tamanho de $< 3,14 \mu\text{m}$ [107], novos estudos são necessários para estimar o potencial genotóxico de partículas de PGM incluindo o Pd. Partículas com um tamanho de $< 10 \mu\text{m}$ atingem a região traqueobrônquica com uma probabilidade de 50%, enquanto que as partículas de $< 4 \mu\text{m}$ são principalmente respiráveis, ou seja, depositam-se na região alveolar do pulmão humano. Portanto, essa fração de partículas pode representar um risco toxicológico para os seres humanos [130].

1.3.3 A electroquímica do paládio

O paládio e os metais do grupo da platina, ao qual o paládio pertence, ganharam atenção renovada à luz de catálise industrial e tecnologias de redução de poluição [132, 133]. A pesquisa actual está direccionada para a exploração das características primárias do paládio, com interesse especial em hidrogenação [134], catálise [135, 136] e nanotecnologia [137, 138], mas também em aplicações térmicas [139-141] e medicinais [114, 142]. Sendo uma alternativa um pouco mais barata à platina, intrinsecamente selectivo ao hidrogénio e um bom catalisador para oxidações [143, 144], actualmente o paládio tem um papel fundamental na pesquisa de pilhas de combustível e é extensivamente utilizado na combustão catalítica, na oxidação do metanol, no armazenamento e detecção (como sensor) de hidrogénio [134, 145, 146].

Nos últimos anos, o estudo dos fenómenos e a manipulação de materiais ao nível atómico e molecular, onde as propriedades podem diferir significativamente das propriedades à escala macro, conduziu ao desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de nanoestruturas através do controlo de forma e tamanho à escala nano.

Vários materiais, como nanopartículas, nanofios, nanotubos, nanodots, entre outros [147-149], têm um interesse especial devido às propriedades ópticas, magnéticas, electrónicas e químicas únicas. Tais materiais estruturais têm um potencial uso na microelectrónica, optoelectrónica e nanodispositivos electrónicos. As nanopartículas de paládio, em particular, são vistas como electrocatalizadores ideais devido à área superficial aumentada em conjunto com as propriedades específicas do paládio [150, 151].

Uma variedade de compostos químicos e métodos físicos [152-157] podem ser empregues para a preparação de nanoestruturas de metais nobres. O controlo do tamanho e da forma da nanoestrutura é um das características mais importantes da metodologia de preparação, e determina as suas propriedades optoelectrónicas e fisicoquímicas. A formação controlada de nanoestruturas de paládio é uma preocupação actual em nanotecnologia aplicada à catálise. A eficiência do processo catalítico está fortemente dependente da morfologia, tamanho, forma, propriedades cristalográficas e da distribuição das nanoestruturas de paládio, que em troca são afectada pelo método de preparação, precursor e ambiente químico [154, 158, 159].

A construção controlada de nanoestruturas electrodepositadas numa superfície de eléctrodo para executar uma tarefa específica, traz uma série de vantagens quando comparado com os macroeléctrodos, com ênfase especial no transporte efectivo de massa elevado, que catalisa e controla o ambiente local [160]. Os electródos modificados com nanopartículas também permitem uma difusão convergente, em vez de linear, que resulta numa taxa alta de transporte de massa na superfície de eléctrodo [161]. Por outro lado, as propriedades catalíticas de algumas nanopartículas causam uma diminuição no potencial necessário para uma reacção redox [162, 163].

Foram investigados muitos metais com respeito aos seus possíveis papéis na modificação de superfícies de eléctrodo com nanopartículas e nanofios [152-154]. Entre outros, metais nobres como ouro [155, 164], prata [153, 156] e platina [152, 153, 157] mostraram uma maior estabilidade, enquanto o níquel [165], cobre [166, 167] e ferro [168] revelaram alguns problemas devido à fácil oxidação em solução ou ao ar.

A investigação do comportamento electroquímico do paládio começou há aproximadamente cinco décadas atrás [169-173], utilizando eléctrodos de metal de paládio [149, 154] ou, mais recentemente, electródos de ouro [152, 153] ou de carbono [151, 163] modificados com paládio de maneiras diferentes. Uma primeira tentativa para a electrodeposição do paládio em condições bem definidas foi feita por Ibl e colaboradores em 1973, estudando a actividade catalítica do pó de metal de paládio, tanto na superfície de um eléctrodo de paládio, como também numa suspensão de partículas de carbono activado [169], com o objectivo de obter grandes áreas activas com uma quantidade mínima de metal. A electrodeposição de paládio no eléctrodo de carbono vítreo, como modelo para o estudo tridimensional de nucleação e crescimento, foi inicialmente documentada por Bell e Harrison [174].

As técnicas de microscopia, como microscopia de força atómica (AFM) e microscopia electrónica de varrimento foram utilizadas para investigar a morfologia das superfícies de eléctrodos de grafite modificados com nanopartículas de paládio electrodepositado [137, 138, 153] e dos nanofios obtidos através da deposição electroquímica nos bordos dos degraus do eléctrodo [171, 175, 176].

Uma propriedade única do paládio entre os metais nobres é sua capacidade elevada de adsorver hidrogénio molecular, na sua superfície, e de o absorver dentro de sua rede atómica, o que confere ao paládio uma importância fundamental em muitos processos industriais como catálise, pilhas de combustível e eventualmente armazenamento de hidrogénio [102, 177-179]. Por isso, a pesquisa electroquímica do paládio pode ser dividida em investigações relacionadas com a interacção do hidrogénio com o paládio e investigações relacionadas com a cinética e mecanismo de crescimento do filme de óxido de paládio. A complexidade do comportamento electroquímico do paládio em meio aquoso é bem conhecida [135, 180-185]. Entre as possíveis reações envolvidas são: a absorção de oxigénio, a formação de pre-óxidos, a formação de óxidos e a dissolução do metal [182, 183, 186, 187].

Uma característica importante é a formação de pre-óxidos que inicia num processo designado por formação incipiente de pré-óxidos ou pré-oxidação monocamada que ocorre a potenciais significativamente mais negativos que o potencial exigido para iniciar a formação da monocamada de óxidos convencionais [188]. Embora a existência deste processo seja um assunto controverso, a formação incipiente de pré-óxidos torna-se relevante para a electrocatálise. Os baixos potenciais envolvidos são atribuídos ao facto de que a formação incipiente de pré-óxidos ser limitada na superfície do metal com um baixo número de coordenação, *i.e.* adátomos [189]. A estes adátomos falta a energia normal de estabilização da rede, tornando-se assim numa forma activa do metal, o que pode explicar o baixo potencial observado [187, 190-192].

Devido à informação controversa relativa ao comportamento do paládio na superfície dos eléctrodos de carbono, ainda é preciso ter em consideração especial os parâmetros de electrodeposição, com respeito ao comportamento electroquímico e as características topográficas [159, 163], do ponto de vista das aplicações práticas.

Os resultados obtidos e as informações recolhidas sobre o comportamento electroquímico do paládio permitiram a elaboração de um estudo sistemático para explicar o mecanismo de interacção de vários iões metálicos, entre quais o Pd^{2+} , com a dupla cadeia do B-ADN, utilizando técnicas voltamétricas e de AFM [193, 194].

1.4 Complexos de metais como agentes anti-cancro

A existência de uma relação entre o cancro e os metais é hoje amplamente reconhecida. No entanto, diversos aspectos desta relação precisam ainda de ser esclarecidos, não só para uma melhor compreensão dos mecanismos de acção dos metais nos sistemas biológicos, mas também para descobrir meios eficientes de proteger as células contra as mutações, como modo de evitar a ocorrência do cancro. A maior parte dos danos no ADN parecem ser mediados por radicais livres induzidos pela presença de certos metais; além disso, vários metais são capazes de inibir a reparação do ADN [195], quer directamente pelos radicais livres ou substituição de zinco nos domínios proteicos, quer indirectamente através da diminuição do nível do antioxidante glutathiona.

Contudo, a importância dos compostos metálicos na medicina é incontestável, como pode ser avaliado pela utilização no tratamento de várias doenças: antimónio (como anti-protozoário), bismuto (anti-ulceroso), ouro (anti-artrítico), ferro (anti-malária), prata (antimicrobiano) e platina (anti-cancro) [196, 197]. Em termos de actividade anti-tumoral, uma vasta gama de compostos de metais de transição e do grupo de elementos principais foram investigados na busca de um tratamento eficiente. Um dos primeiros relatórios sobre a utilização terapêutica de metais ou compostos com metais para o tratamento da leucemia e do cancro data à volta do século XVI [198].

Uma vez que o cancro é o resultado das mutações acumuladas no ADN, o tratamento ao nível molecular, selectivo e específico, poderia ser o único tratamento realmente eficaz. Tais terapias estão apenas a começar e só pode ser previsto que irão necessitar um longo tempo para atingir a eficácia e a segurança desejada em ensaios clínicos.

1.4.1 Complexo de paládio com o ácido lipóico

O complexo de paládio com o ácido lipóico (Pd-LA – “palladium-lipoic acid”) foi originalmente concebido como um agente quimioterapêutico não-tóxico, numa versão com prescrição médica, chamado “DNA Reductase”. O complexo consiste num átomo de paládio ligado a uma molécula de ácido lipóico (LA) proporção de 1:1 [199].

Este arranjo é único na medida que permite ao complexo ser solúvel tanto em água como também nos compartimentos lipídicos [200, 201]. A presença do antioxidante, LA [202, 203], bem como a adição de uma fonte energética alternativa, o paládio [200, 204, 205], levaram a considerar que o complexo Pd-LA poderia ser usado com sucesso no tratamento de vários cancros [200, 206, 207].

Acredita-se [208] que o Pd-LA pode actuar no complexo I da mitocôndria, o complexo de desidrogenase pirúvica. O complexo Pd-LA oscila entre uma forma oxidada e uma forma reduzida de modo a aceitar electrões dos radicais livres e doá-los para o sítio enzimático, fornecendo energia às mitocôndrias para facilitar a produção de ATP em células saudáveis. Também pode actuar como oxidante para os ácidos gordos da membrana, servindo como um interruptor redox para fornecer um fluxo contínuo de equivalentes de redução ao ADN, protegendo-o contra a oxidação [200].

No entanto, as células cancerígenas mudam para um metabolismo anaeróbico e, portanto, funcionam num ambiente hipóxico [209-211]. Uma vez que há menos oxigénio e mais electrões nas células cancerígenas, ocorre a geração de radicais livres na mitocôndria [208], o que activa o mecanismo da apoptose. Assim, as células cancerígenas serão submetidas aos efeitos tóxicos do complexo Pd-LA através da mitocôndria, enquanto as células dependentes da respiração aeróbia, submetidas a isquémia ou hipóxia, serão protegidas de danos.

O LA, ligando no complexo Pd-LA, é um antioxidante endógeno bem conhecido; quando suplementado, pode actuar de maneira a atenuar os efeitos secundários na terapia do cancro [212], onde os fármacos utilizados são promotores de estresse oxidativo, ou na terapia de doenças relacionadas com estresse oxidativo [213-216], quer directamente, como antioxidante [217-219], quer indirectamente devido à sua acção sinérgica com outros antioxidantes [220].

O Poly-MVA é um suplemento nutritivo líquido com base no complexo Pd-LA. No Poly-MVA, o Pd-LA encontra-se como polímero obtido pela trimerização do complexo com uma molécula de tiamina [199]. Além da unidade central, o complexo Pd-LA, o suplemento Poly-MVA também contém LA livre [221, 222], minerais (molibdeno, ródio, ruténio), vitaminas (B1, B2, B12) e aminoácidos (N-acetilcisteína e formilmetionina).

Foi demonstrado que o complexo Pd-LA no Poly-MVA pode regularizar a morte celular provocada pela isquémia e pode ser um potencial agente neuroprotector para as vítimas de um ataque isquémico transitório, paragem cardíaca, acidentes anestésicos, ou afogamento [208]. Estudos toxicológicos mostraram que este não provoca acumulações ou quaisquer tipo de danos nos tecidos, e a dose letal média LD₅₀ em ratos é superior a 5000 mg kg⁻¹ (a mais alta dose testada) [208]. O teste de avaliação do potencial mutagénico, Ames, confirmou que o complexo está livre de mutagenicidade [208].

O Poly-MVA parece oferecer múltiplos benefícios terapêuticos como modulador metabólico selectivo devido aos seus múltiplos sítios de acção. Como molécula redox, tem a capacidade de proporcionar às células uma fonte energética alternativa e mantém a eficácia da mitocôndria através da transferência de electrões para o complexo I, estabilizando assim a integridade da mitocôndria. Enquanto este efeito favorece as células normais e as células afectadas pelo ataque isquémico, torna-se prejudicial para as células malignas. Além disso, a sua capacidade como antioxidante torna-o adequado para eliminar os radicais livres associados com o envelhecimento ou como resultado da reperfusão. Contudo, num ensaio de competição foi mostrado que a administração suplementar de LA afecta os benefícios redox do Poly-MVA [208]. No entanto, o LA sozinho oferece apenas uma fracção da protecção contra o ataque isquémico oferecido pelo Poly-MVA [208].

1.4.2 Complexos de platina

Durante os últimos 60 anos, o foco da investigação na area de quimioterapia oncológica tem sido direccionado não só para compreender melhor o mecanismo de citotoxicidade, mas também para a descoberta de agentes quimioterapêuticos mais seguros e mais selectivos. Como resultado, uma variedade de compostos estruturalmente distintos surgiram, que possuem as propriedades citotóxicas desejadas, e ainda, em alguns casos, têm drasticamente reduzido a toxicidade. Uma dessas classes estruturais são os agentes alquilantes, e incluem [223]: mostardas de azoto, oxazafosforinas, triazenes, nitrosoureas, mitomicinas, e complexos de platina.

Uma característica comum desta classe de compostos é a capacidade de alquilar grupos nucleofílicos endógenos, principalmente o ADN.

Os agentes alquilantes incluem um grande número de moléculas [20] e podem ser divididos em dois grupos, mono- e bi-funcionais. Os agentes monofuncionais têm apenas um grupo reactivo que está envolvido na interacção covalente com um único centro no ADN. Os agentes bifuncionais têm dois grupos reactivos e têm a capacidade de reagir com dois centros no ADN. Se os dois centros encontram-se em cadeias diferentes no ADN, a reacção de um agente bifuncional, como mostardas de enxofre ou de nitrogénio, pode produzir uma ligação cruzada das cadeias. Muitos dos agentes alquilantes têm um efeito mutagénico e são potenciais causadores de doenças cancerígenas.

O principal mecanismo químico de alquilação é uma reacção em que o agente electrófilo (agente alquilante) reage com as regiões ricas em electrões das bases e dos resíduos fosfodiéster da espinha dorsal. Os nitrogénios dos anéis, sendo mais nucleofílicos do que os oxigénios, são conhecidos por serem os mais reactivos na interacção com os agentes alquilantes. Assim, o N7 da guanina e o N3 da adenina são os sítios mais reactivos. A espinha dorsal fosfodiéster do ADN também pode sofrer uma reacção de alquilação através da interacção do agente com o oxigénio, o que resulta na formação de fosfotriésteres. No entanto, nem todos os agentes alquilantes reagem directamente com o ADN, alguns necessitando uma activação metabólica.

Existem diferenças significativas entre a alquilação dos nucleosídeos e dos polinucleótidos. A presença dos grupos de fosfato é a estrutura secundária influencia a disponibilidade dos sítios reactivos no ADN. No caso do ADN em cadeia simples (ssDNA) os principais sítios de alquilação são os mesmos que para os nucleósidos, mas a extensão da reacção é diferente. O tipo de base na vizinhança ou a carga global do nucleotídeo pode afectar o potencial nucleofílico da base no ADN. Se o resíduo é guanina ladeada por outra guanina, o potencial electrostático negativo do N7 da guanina é reforçado, assim proporcionando um melhor ambiente para o ataque electrofílico dos agentes alquilantes. No entanto, o aumento da carga negativa do agrupamento alquilante diminui o potencial nucleofílico da base.

Os efeitos estéricos também desempenham um papel importante na reação entre o agentes alquilantes e os sítios nucleofílicos no ADN. Para a conformação de hélice dextrogira (B-ADN), o acesso nos locais nucleofílicos do ADN difere entre o sulco maior e sulco menor. Para os resíduos de guanina no B-ADN os átomos O6 e N7 encontram-se no sulco maior e podem ser facilmente acessados pelo agente alquilante. Em contrapartida, o relativamente reactivo N3 da adenina está no sulco menor, que é menos acessível devido ao efeito estérico da forma B-ADN. A alquilação directa do ADN, actuando através da modificação covalente de uma base, tem assim a capacidade de gerar bases alteradas, que levam a mutações, e lesões que bloqueiam a replicação.

O mesmo mecanismo que torna tóxicos os agentes alquilantes permite-lhes a utilização como agentes antineoplásicos alquilantes [20]. O ADN danificado exige mecanismos de reparação do ADN, que por sua vez activa a apoptose quando a reparação se revela impossível. Como as células cancerígenas proliferam de uma forma não restritiva, alguns agentes alquilantes são usados clinicamente para parar o crescimento tumoral através de ligações cruzadas das cadeias de ADN. As ligações cruzadas tornam as cadeias incapazes de se separar, processo necessário para a replicação do ADN, e as células não conseguem mais a divisão. Outros agentes (mono-alquilantes) não impedem a separação das cadeias do ADN, mas impedem o acesso de certas enzimas ao ADN. O resultado final é a inibição da divisão celular ou a estimulação da apoptose. Infelizmente, estas drogas actuam de maneira não-específica, o alvo sendo tanto o ADN das células tumorais como também o das células saudáveis, levando a efeitos secundários graves.

Desde a descoberta acidental dos efeitos da platina na divisão bacteriana, em 1965 por Rosenberg e colegas [224], uma série de investigações e estudos foram iniciados para esclarecer os efeitos dos compostos de platina sobre a divisão celular, que culminaram na síntese de cisplatina.

As drogas quimioterápicas à base de platina (denominadas análogos de platina), constituem uma das mais importantes classes de agentes antineoplásicos alquilantes, e hoje inclui, além da cisplatina, a carboplatina, oxaliplatina, satraplatina e, entre os mais recentes, a nedaplatina e a triplatina tetranitrato.

O mecanismo de genotoxicidade da cisplatina é bem conhecido [129]. As concentrações elevadas de íons de cloreto no plasma sanguíneo de aproximadamente 100 mM reprimem a actividade da cisplatina, enquanto os baixos níveis intracelulares de ≈ 4 mM activam a cisplatina, que rapidamente perde os seus aniões de cloreto formando o catião electrofilico final, $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, altamente reactivo e mutagénico. Este forma ligações cruzadas principalmente dentro das cadeias, entre guaninas adjacentes. Em contraste, a transplatina forma crosslinks principalmente entre guaninas e adeninas pertencendo à mesma cadeia de ADN ou a cadeias diferentes.

A cisplatina tem um ampla utilização numa variedade de tipos de tumores sólidos [223], no entanto, o seu uso leva a importantes efeitos secundários: nefro- e neurotoxicidade, ototoxicidade, imunossupressão, radiosensibilização, náusea e vômitos [225]. Embora a cisplatina seja um agente quimioterapêutico altamente eficaz, tem como limitação a resistência, e os mecanismos estabelecidos [129, 226] incluem a redução da acumulação intracelular de cisplatina, o aumento da reparação do ADN, a alteração da expressão de genes regulatórios e a tolerância. O isómero geométrico da cisplatina, a transplatina, também forma complexos com o ADN, mas não é eficaz como agente quimioterapêutico [227, 228].

Vários complexos de fórmula geral ML_2X_2 foram sintetizados e caracterizados a fim de estudar os efeitos do metal e dos grupos L (inerte) e X (de substituição) sobre as propriedades estruturais e cinéticas envolvidas na actividade biológica [229]. No entanto, problemas significativas ainda existem, incluindo os efeitos colaterais, a toxicidade, a especificidade para certos tipos de cancro e especialmente a resistência adquirida. Consequentemente, a investigação para o desenvolvimento de novos análogos à cisplatina tem sido focalizada para ultrapassar tanto a resistência à cisplatina, como também aliviar alguns dos mais graves efeitos secundários. Igualmente, os compostos mais recentes têm procurado atingir a biodisponibilidade oral [223, 230].

1.4.3 Complexos multinucleares de paládio com poliaminas biogénicas

A direcção no desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos levou a sintetização de compostos fora da esfera habitual de coordenação: complexos organometálicos, complexos com o elemento metálico diferente de platina, como por

exemplo paládio [231-233], complexos de platina com geometria trans [227, 228, 234], ou complexos multinucleares [235].

Os complexos multinucleares de platina constituem uma única nova classe de agentes anticancerígenos com propriedades químicas e biológicas distintas das drogas mononucleares de platina [236, 237]. As interações dos complexos multinucleares com o ADN são notavelmente diferentes das interações da família de compostos mononucleares à base de cisplatina em uso clínico [236]. Foi também demonstrado que os complexos multinucleares produzem adutos ao ADN cujo carácter é diferente quando comparado com os compostos mononucleares de platina convencionais [238-241], sugerindo a possibilidade de escapar ao convencional mecanismo de resistência a cisplatina relacionado com o reconhecimento e a reparação dos danos no ADN.

Ao analisar as relações entre a estrutura e a actividade dentro desta classe de compostos, os complexos multinucleares de platina ligados a poliaminas lineares representam uma nova sub-classe de compostos multinucleares com promissora actividade pré-clínica [236, 237]. Uma série de trabalhos têm sido publicados sobre a síntese de compostos com o centro metálico de Pd(II) [232, 233, 242, 243], como uma alternativa à platina. Os resultados obtidos com os complexos de paládio indicam que este tipo de compostos têm uma baixa actividade antitumoral, atribuída à alta labilidade do centro de paládio e à alta reactividade de paládio com a maioria das moléculas celulares que pode facilmente resultar numa redução da sua capacidade de ligar ao ADN [232, 233].

Na tentativa de superar estes problemas, diversos autores [232, 233] têm indicado que o uso de ligandos quelatantes podem reduzir a reactividade do centro de paládio e que também podem provocar o deslocamento do equilíbrio cis \leftrightarrow trans no sentido da formação de isómeros cis. Além disso, o uso de ligandos quelatantes com actividade biológica relevante e com afinidade para ADN em conjunto com o centro de metal também poderia conferir propriedades de reactividade específica aos complexos de paládio.

As poliaminas biogénicas foram seleccionadas porque são carregadas positivamente e também estão envolvidas na proliferação e diferenciação de células. A potencial importância destes ligandos em complexos de paládio foi sugerida num

estudo *in vitro* [232], onde um complexo de paládio com espermidina mostrou maior actividade antiproliferativa do que a cisplatina. Assim, complexos multinucleares com dois ou três centros metálicos análogos à cisplatina e com poliaminas biogénicas como ligandos [244-247] têm o potencial de superar a resistência à cisplatina e à carboplatina devido a formação de aductos maiores ao ADN, flexíveis, não-direccionais e capazes de realizar ligações cruzadas das cadeias do ADN.

1.4.4 Ligandos

Os ligandos são moléculas que podem doar ou aceitar electrões para formar uma ligação covalente coordenada com o átomo de metal central de um complexo de coordenação [248]. Este termo é especialmente usado para designar uma molécula pequena que liga especificamente a uma molécula maior, por exemplo um antígeno que liga a um anticorpo, uma hormona ou neurotransmissor que liga a um receptor ou um substrato que liga a uma enzima.

1.4.4.1 Ácido α - Lipóico

O ácido α -lipóico (ALA – “alpha lipoic acid”), igualmente conhecido como o ácido tioctico, é uma coenzima natural presente nas células procariotas e eucariotas, assim como nos animais e nas plantas. O composto foi isolado pela primeira vez em 1951 por Reed e colaboradores [249] dos resíduos insolúveis de fígado processado.

No corpo humano o ácido α -lipóico é sintetizado na mitocôndria numa forma ligada a uma proteína [250], a partir de um ácido octanóico [251] e tem um papel importante na produção de energia e no catabolismo dos ácidos α -ceto e dos aminoácidos [252]. O ALA tem um centro quiral na posição 6 e existe como dois enantiómeros: R (+) e S (-) ácido α -lipóico, a mistura racémica sendo igualmente referida como o ácido tioctico [220]. Somente o isómero R do ácido α -lipóico é sintetizado endógeno e ligado à proteína.

O anel ciclopentano no ácido lipóico inclui uma ponte dissulfídica que pode sofrer uma redução reversível nas células ao ácido dihidrolipóico (DHLA – “dihydrolipoic acid”) e transfere átomos de hidrogénio do piruvato ao FAD no sistema

enzimático de desidrogenase do piruvato, uma reação bioquímica importante na produção de energia celular [220, 253]. Um produto biológico da oxidação do ALA foi identificado como o S-óxido ácido lipóico (um tiolsulfonato) e é designado por ácido β -lipóico (β -lipoic acid – BLA) ou o protogénio B [254-256]. As estruturas químicas de ALA e seus compostos relacionados estão apresentadas na **Fig. 1.25**.

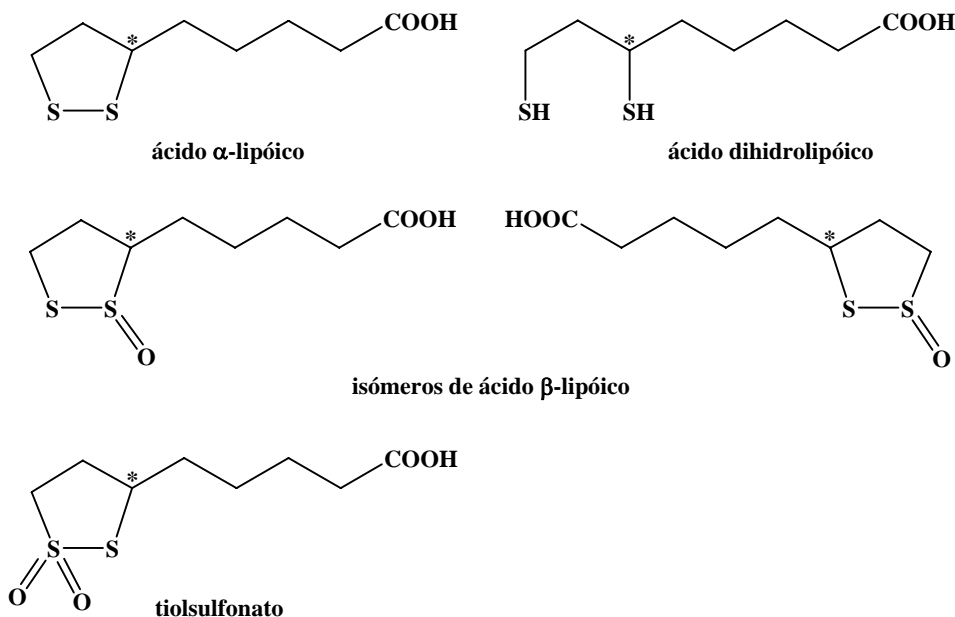


Figura 1.25 – Estrutura molecular do ácido α - lipóico e dos compostos relacionados.

ALA e DHLA são antioxidantes solúveis em água e em lípidos, sendo capazes de limpar com muita eficiência as espécies reactivas do oxigénio, tal como o anião superóxido, os radicais hidróxilo, o peróxido de hidrogénio (somente DHLA) [218, 257] e aniões de hipoclorito [217, 258] tanto nos compartimentos aquosos como também nos compartimentos hidrofóbicos da célula. Recentemente mostrou-se que *in vitro* ALA e DHLA actuam como antioxidantes também contra os radicais dióxido e carbonato de nitrogénio, derivados do peroxinitrito, com a formação de um radical catião do ácido lipóico. No entanto, o mesmo seria menos provável acontecer *in vivo* devido à competição com outros antioxidantes presentes em concentrações elevadas no meio fisiológico [219].

In vitro, ALA e DHLA exibem capacidades de quelação formando complexos estáveis com os metais de transição, tais como Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} com ALA e Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} e Pd^{2+} [199] com DHLA [259]. Assim, ALA e DHLA podem proteger duma maneira eficaz contra a peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a toxicidade causada pelos metais em sistemas biológicos [260-262]. Os estudos mostram que somente o DHLA pode regenerar os antioxidantes endógenos, tais como as vitaminas C e E, a glutathiona e a coenzima Q_{10} , e reparar os danos oxidativos [220, 263]. Por outro lado, o ácido lipóico na sua forma reduzida pode mostrar efeitos pró-oxidativos [264, 265] que causam a oxidação das proteínas celulares, mas esta acção é inibida na presença de ALA [264].

Tendo em consideração as propriedades únicas deste par redox, o ácido lipóico é utilizado como antioxidante em misturas racémicas como suplemento nutricional dietético por atletas, na dermatologia para impedir os efeitos do envelhecimento [266], mas igualmente na terapia das doenças associadas ao dano oxidativo, tal como a polineuropatia diabética [213], a esclerose múltipla [215, 216, 267], a doença do Alzheimer e demências relacionadas [214]. O ácido lipóico pode também actuar como tampão na terapia do cancro onde as drogas usadas são promotores conhecidos de dano oxidativo, seja directamente como antioxidante contra os radicais livres, ou indirectamente devido à sua acção sinérgica com outros antioxidantes [212]. O ALA mostrou também ter um efeito pró-apoptótico em linhas de células tumorais, surgindo daqui o seu potencial uso no tratamento de desordens neoplásicas.

Embora o ácido lipóico esteja presente numa variedade de plantas (espinafre, bróculos, tomates, ervilhas, couves de Bruxelas, batatas, trigo [259] e nos alimentos provenientes dos animais (rins, coração, fígado – órgãos com actividade metabólica elevada [268]), a informação quantitativa sobre o conteúdo de ácido lipóico livre ou a sua forma ligada a proteína (lipoillisina) é limitada. O consumo de dos alimentos ricos em ácido lipóico não parece aumentar o ácido lipóico livre no plasma ou nas células [269, 270], mas doses orais da mistura racémica do ácido lipóico livre resultou em aumentos transientes significativos no plasma e nas células, com uma absorção de 30-40% da dose oral [269, 271].

Técnicas diferentes foram empregues para a determinação de ALA e de DHLA, a partir de ensaios microbiológicos [272] e colorimétricos [273], electroforese capilar [274], cromatografia de gás [275] e HPLC com detecção ultravioleta, de fluorescência e detecção electroquímica [259, 276]. Somente a detecção electroquímica parece mais eficaz por ser menos laboriosa e por conseguir distinguir entre a forma oxidada e reduzida do ácido lipóico. As técnicas electroquímicas foram empregues com sucesso para a determinação do ácido lipóico [277]. A desvantagem principal em usar métodos electroquímicos é a necessidade de uma etapa de hidrólise no caso da forma ligada à proteína do ácido lipóico [276], mas um número crescente de estudos está a mostrar que o ácido lipóico livre é a forma terapêutica mais importante [269, 271, 278-281], assim o desenvolvimento de um procedimento conveniente e rápido para a avaliação do conteúdo em ácido lipóico é necessário, preferivelmente sem o uso de mediadores para modificar a superfície do eléctrodo.

A oxidação electroquímica directa do ácido α -lipóico num eléctrodo de carbono vitreo [221] foi executada utilizando as técnicas de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, num intervalo largo de pH, e será apresentada no *Capítulo 4*. O mesmo método foi empregado para a detecção do ácido lipóico e a determinação do seu conteúdo em duas amostras comerciais, presentes no mercado como suplementos nutritivos, o xarope *Poli-MVA™* e cápsulas vegetais de ácido α -lipóico da *Solgar (Solgar-ALA)*.

1.4.4.2 Poliaminas biogénicas: espermidina e espermina

As aminas biogénicas são bases orgânicas que ocorrem naturalmente em animais, plantas e microorganismos, com uma gama extensiva de actividades biológicas como neurotransmissoras, hormonas ou biomoduladores. As aminas biogénicas incluem catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina), indol-aminas (serotonina e melatonina), imidazol-aminas (histamina) e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). A acetilcolina também é incluída nas aminas biogénicas. Os precursores das aminas biogénicas são aminoácidos: tirosina (para catecolaminas), triptofano (para indol-aminas), histidina (para imidazol-aminas) e ornitina (para poliaminas) [282].

Embora sendo necessárias para muitas funções críticas no organismo humano e animal, o consumo de alimentos que contém um alto teor de amins biogénicas pode causar efeitos toxicológicos. Nos alimentos, as amins biogénicas são produzidas principalmente pela quebra de aminoácidos devido à acção de enzimas de origem microbiana. A dose tóxica de amins biogénicas é fortemente dependente da eficiência do metabolismo que pode variar consideravelmente entre indivíduos. As enzimas implicadas no metabolismo destas amins também podem ser inibidas através de factores exógenos. Sintomas podem ocorrer principalmente em conjunto com factores potencializadores como álcool, outras amins, medicamentos e doenças gastrointestinais. Algumas das amins biogénicas, especialmente as poliaminas putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, foram usadas como indicadores de decomposição dos alimentos [283].

As poliaminas são compostos alifáticos policatiónicos presentes em todas as células eucariotas em concentrações relativamente altas, frequentemente ao nível milimolar [15, 284], com um papel signficante na regulação e proliferação das células normais e malignas. As poliaminas afectam a proliferação da célula, a diferenciação, a réplicação do ADN, a síntese de proteínas e a actividade de várias enzimas. O conteúdo de poliaminas em células tende a ser stoiquiométrico com o conteúdo do ARN, sendo concentradas nos ribosomas e também no núcleo. Dois moles de poliaminas estão normalmente presentes por cada mol de qualquer tRNA isolado [15].

Em condições iónicas fisiológicas as poliaminas são carregadas positivamente. Os grupos de fosfato negativamente carregados no ADN são então objectivos principais para a interacção de poliaminas por forças electrostáticas, estabilizando o ADN contra desnaturação térmica [285] e dano por radiação [286]. Além disso, as poliaminas são capazes de provocar uma transição conformacional no poly(dG-dC) da sua forma habitual de B-ADN dextrógira para a forma levógira de Z-ADN [287, 288]. Por exemplo, a espermina ancorada no sulco maior do B-ADN estabiliza o complexo assim formado, maximizando as interacções entre os aceitadores de protões no ADN e os doadores de protões da espermina [289]. As poliaminas também podem estabilizar a estrutura do ADN dobrado ou condensado em super-hélices [290, 291].

O interesse no estudo clínico das poliaminas surgiu depois da demonstração por Russell em 1971 de uma excreção elevada das mesmas na urina de pacientes com cancro [292, 293]. A investigação anterior já tinha mostrado a presença das poliaminas livres em doenças como cistinúria, raquitismo e até em urina normal [294-296], enquanto Perry e colegas mostraram a presença de formas conjugadas de poliaminas na urina de pacientes esquizofrénicos [297].

O aumento das poliaminas nos sistemas proliferativos é devido ao facto que a actividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC), que dá origem a putrescina, é estimulada em qualquer "processo de crescimento" [298]. A biogénese de poliaminas é mostrada em **Fig. 1.26**.

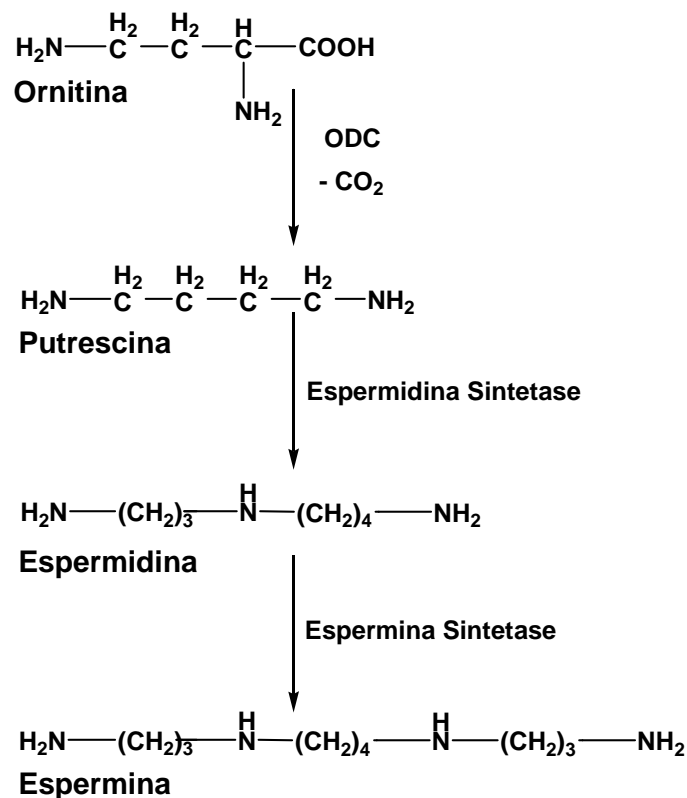


Figura 1.26 – Representação esquemática da biogénese de poliaminas alifáticas [298].

A putrescina é formada directamente do amino ácido ornitina, por descarboxilação do mesmo, e em seguida é convertida em espermidina pela espermidina sintetase por transferência de um grupo propilamino. A espermina, a mais

complexa poliamina encontrada só em células eucariotas, é formada por transferência de um segundo grupo propilamino ao espermidina. Como breve nota histórica, foi em 1678 que o Anthony von Leeuwenhoek, com um dos primeiros microscópios, observou a espermina nos cristais de sal de fosfato em sêmen humano [299].

Foi observado que a produção de espermidina é favorecida por níveis altos de ODC e de espermidina sintetase, e está relacionada com o processo de crescimento efectivo. A produção e acumulação de espermina surge devido a alta actividade da enzima espermina sintetase, mas actividade baixa da ODC, estando relacionada com o processo de diferenciação da célula [298].

Russell usou o conhecimento da biogénese de poliaminas para avaliar o sucesso quimioterapêutico no cancro, sendo que o crescimento rápido associado com o estado neoplásico é caracterizado pelo aumento da produção, e excreção, de putrescina e espermidina [300, 301]. Mas a maioria das células contém muito mais espermidina e espermina do que putrescina [298] e, embora um bom resultado do tratamento fosse uma diminuição da produção de poliaminas, o efeito imediato da terapia é a libertação de quantidades significativas de espermidina e espermina das células destruídas. Este mesmo efeito foi mostrado pelo grande aumento de espermidina no protoplasma e urina durante os primeiros dias de terapia eficaz [300, 301].

Foi também observado que embora os níveis de poliaminas aumentam nos cancros, outras condições patológicas que envolvem a proliferação celular, morte celular, condições inflamatórias e infecções bacterianas mostram também níveis elevados de poliaminas. O uso da análise de poliaminas como teste para detecção do cancro foi criticado devido aos resultados falso-positivos [298, 302].

As poliaminas tem várias funções, desde a substituição do K^+ e Mg^{2+} nas células [303] até cumprir um papel essencial na regulação da síntese dos ácidos nucleicos e proteínas. As poliaminas também podem modular os canais iónicos do coração, dos músculos e dos neurónios [304].

A síntese de poliaminas é regulada fortemente através da enzima ODC cuja concentração aumenta rapidamente na maioria das espécies com a iniciação na diferenciação celular ou com a transformação para um estado neoplásico. A síntese da enzima parece ser regulada por repressão pela espermidina, através de um mecanismo

de feedback, e por inactivação na presença de um certo nível de putrescina [15]. Um outro mecanismo de inactivação é a síntese de um inibidor específico chamado antizima com respeito à presença de putrescina, espermidina ou espermina. Se a síntese celular de poliaminas for inibida, a divisão celular é parada ou severamente retardada, mas o suplemento exógeno de poliaminas restabelece a taxa de crescimento das células.

Tanto as células procariotas como também as células eucariotas [15] têm um sistema transportador de poliaminas na membrana que facilita a internalização de poliaminas exógenas [305]. Este sistema é altamente activo em células que proliferam rapidamente e é actualmente o objectivo de alguns estudos para o desenvolvimento de novas terapias anti-cancro através da combinação de vários inibidores da síntese de espermidina, ou dos precursores de outras poliaminas, que podem reduzir a velocidade de divisão celular.

No que respeita ao catabolismo das poliaminas, os mecanismos estão menos entendidos do que a biogénese das mesmas. A oxidação da espermina a espermidina, e em seguida a putrescina, parece acontecer no organismo e uma quantidade significativa destas diaminas é excretada na urina [15]. Em geral, todas as aminas biogénicas sofrem desaminação oxidativa, metilação, acetilação e/ou hidroxilação e os metabolitos são excretados na urina [283]. De ponto de vista clínico, as doenças hiperproliferativas são caracterizadas por níveis altos de poliaminas na urina e é esperado que a inibição adequada da divisão celular possa permitir o tratamento quimioterapêutico mais agressivo do cancro. Paradoxalmente, foi também comprovado que os metabolitos resultantes da oxidação de poliaminas funcionam como inibidores efectivos da proliferação das células [303].

Com o objectivo de encontrar novas terapias anticancro, recentemente as poliaminas foram contempladas no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, sendo empregadas como ligandos em complexos de metais multinucleares [232, 233, 236, 244-246]. Estes complexos contêm mais do que um centro metálico para uma eficácia maior na ligação ao ADN, e foram pensados como alternativas melhoradas para a cisplatina, cuja actividade anti-cancro, mas também toxicidade, é bem conhecida.

Nestes complexos, as poliaminas, particularmente a espermidina e a espermina, podem formar um tipo de andaime molecular devido aos grupos catiónicos localizados a

intervalos regulados, tornando possível a ligação selectiva aos grupos electronegativos do ADN.

A técnica mais comum para a análise de aminas biogénicas é a cromatografia líquida de alta eficiência, que usa a derivatização com vários reagentes para a detecção por fluorescência e/ou absorção UV [306-308]. A cromatografia de pares iónicos é também uma técnica frequentemente usada, especialmente para a separação de aminas biogénicas não-derivatizadas, mas também em conjunto com a derivatização pós-coluna [309, 310].

A electroforese capilar para a análise de aminoácidos pode ser aplicada para a análise de aminas biogénicas, com as mesmas técnicas de derivatização e modos de detecção, mas os parâmetros de separação requerem uma optimização adicional [283]. A detecção de fluorescência induzida por diode laser habilita à detecção de analitos com os métodos de electroforese capilar [311].

Biossensores electroquímicos (amperométricos) para a determinação do conteúdo de aminas em frutas têm sido fabricados utilizando diamino oxidase (DAO) e poliamino oxidase (PAO) imobilizadas covalentemente numa membrana polimérica. As enzimas na presença de seus substratos produzem H_2O_2 que foi detectado num eléctrodo de platina, com um limite de detecção das poliaminas espermidina e espermina de $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. O intervalo linear para a análise de poliaminas nas amostras reais foi de $2 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ e um tempo de vida de 45 dias [312]. A electrooxidação quantitativa das poli(aminas) alifáticas tem sido realizada nos eléctrodos de (ou modificados com) diamante dopado com boro [313-315] ou eléctrodos de carbono vítreo modificados com níquel [316], utilizando FIA-EC com detecção amperométrica.

Um estudo electroquímico da oxidação directa das poliaminas biogénicas espermidina e espermina no eléctrodo de carbono vítreo [317] foi efectuado utilizando as técnicas de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, num intervalo largo de pH. A técnica de de impulso diferencial foi utilizada também para seguir a interacção das mesmas poliaminas com o ADN, em incubações de curta e longa duração, os resultados sendo apresentados no *Capítulo 6*.

1.5 Electroquímica na caracterização e uso de eléctrodos modificados e biossensores

1.5.1 Princípios de electroquímica

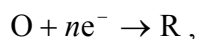
A electroquímica [318] estuda os fenómenos químicos associados à separação de cargas. A separação de cargas pode levar à transferência de carga, esta podendo ocorrer homogeneamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eléctrodo. Para assegurar a electroneutralidade, ocorrem duas ou várias reacções de transferência de carga, em direcções opostas. Normalmente as reacções de transferência de carga estão separadas no espaço, ocorrendo em eléctrodos diferentes, imersos em solução numa célula electroquímica.

Uma célula electroquímica consiste num recipiente com uma geometria variável dentro do qual são imersos três eléctrodos independentes numa solução, estando estes ligados por meios condutores, na solução através do electrólito de suporte, e externamente através de fios ligados a um potenciostato.

Os eléctrodos são: o eléctrodo de trabalho, que é o eléctrodo onde ocorre a reacção electroquímica de interesse, o eléctrodo de referência, que representa o eléctrodo ao potencial do qual são referidos os outros potenciais em termos de uma diferença de potencial, e o eléctrodo auxiliar, sendo entre este e o eléctrodo de trabalho que flui a corrente dentro da célula electroquímica através da solução de electrólito.

Quando a soma das variações de energia livre em ambos os eléctrodos é negativa, a energia eléctrica libertada pode ser aproveitada (baterias). Se for positiva, energia eléctrica exterior é fornecida para que as reacções de eléctrodo ocorram de maneira a converter as substâncias químicas (electrólise).

O processo de transferência de carga, que na maioria dos casos envolve a transferência de electrões [319], no caso mais simples pode ser representado de seguinte forma:



onde O é a espécie oxidada e R a espécie reduzida, O recebendo n electrões para se transformar em R.

O par O/R tem associada uma energia, designada por energia redox, E_{redox} , que pode ser relacionada com o potencial de eléctrodo. Os electrões no eléctrodo (que é um condutor) têm uma energia máxima que é distribuída à volta do nível Fermi, o nível electrónico ocupado mais elevado, E_F , e é só neste circuito que os electrões podem ser fornecidos ou recebidos.

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

Quando se aplica um potencial conhecido ao eléctrodo de trabalho durante uma experiência electroquímica, as espécies electricamente carregadas serão electrostaticamente atraídas para a superfície do eléctrodo; as espécies não carregadas também podem ser atraídas para a superfície do eléctrodo por adsorção. Portanto, quando se descreve um processo de eléctrodo deve ter-se em conta tanto o transporte das espécies para a superfície do eléctrodo como a própria reacção do eléctrodo.

Na célula electroquímica, o movimento de material designa-se por transporte de massa [320]. Os três tipos de transporte mais importantes na electroquímica são: a difusão, a convecção e a migração. A difusão representa o transporte das espécies devido a um gradiente de concentração, a convecção deve-se ao movimento mecânico do fluido e a migração é o movimento das espécies carregadas devido à sua interacção com um campo eléctrico.

Para efeitos electroanalíticos são criadas condições especiais na solução através da adição do electrólito de suporte para que a migração possa ser negligenciada. Se existir convecção, normalmente controlada do exterior, é provável que ocorra a uma distância da superfície do eléctrodo conhecida por espessura da camada de difusão. Na proximidade da superfície do eléctrodo (camada de difusão) as espécies são transportadas só através de difusão. Uma representação esquemática dos processos de eléctrodo está na **Fig. 1.27**.

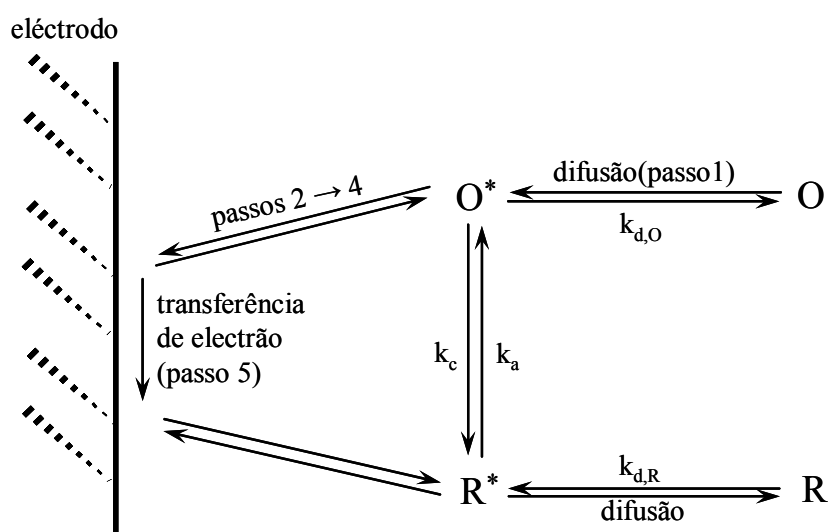


Figura 1.27 – Esquema de transferência de electrão num eléctrodo [318].

Desta figura distinguem-se alguns parâmetros importantes:

- (i) O coeficiente de transferência de massa, k_d , que descreve o processo de difusão da solução fora da camada de difusão. O processo de difusão é descrito pelas leis de Fick, sendo a primeira lei que descreve a difusão e a segunda lei descrevendo a variação da concentração com o tempo.
- (ii) As constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica, k_a , k_c , que descrevem a cinética da reacção do eléctrodo. Estas constantes são descritas pelas equações de Butler-Volmer [321, 322]:

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

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

onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reacção electroquímica; α_a e α_c são os coeficientes de transferência de carga anódica e respectivamente catódica; $E^{\theta'}$ é o potencial formal do sistema. As constantes de velocidade de transferência de carga k_a e k_c dependem do potencial e da constante de velocidade padrão, o que conduz aos seguintes casos extremos:

- $k_d \ll k_0$, corresponde ao caso em que a cinética da reação do eléctrodo é muito mais rápida que o transporte. Então, para qualquer potencial há sempre equilíbrio na superfície do eléctrodo. A corrente é determinada só pelas diferenças de energia electrónica entre o eléctrodo e as espécies na solução e a sua velocidade para alcançar a superfície do eléctrodo. Isto é o caso de uma reacção reversível.
- $k_d \gg k_0$, corresponde ao caso em que são atingidos potenciais muito elevados para que a reacção ocorra. O transporte de massa não tem qualquer influência para a velocidade do processo que é governado pela cinética lenta da reacção. Isto é o caso de uma reacção irreversível.

(iii) A dupla camada electrolítica, e a região interfacial em solução onde ocorrem as reacções electroquímicas e onde o valor do potencial electrostático difere daquele do interior da solução. A designação de “dupla camada” reflecte os primeiros modelos desenvolvidos para descrever esta região. O conceito básico consistia num ordenamento de cargas positivas ou negativas na superfície do eléctrodo e num ordenamento em quantidade igual e de carga oposta na solução para neutralizar a carga do eléctrodo. A função do eléctrodo destinava-se apenas a fornecer/remover electrões à/da interface, dependendo da carga na interface e do potencial aplicado. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eléctrodo e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial na solução é a capacidade da dupla camada.

Em todas as experiências electroquímicas considera-se que durante a reacção de oxidação o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões transferidos e a corrente tem um valor positivo, a corrente anódica, I_a . Ao contrário, durante uma reacção de redução o eléctrodo de trabalho funciona como dador de electrões e a corrente registada tem um valor negativo, a corrente catódica I_c .

1.5.2 Eléctrodos de carbono

A escolha de um material de eléctrodo depende em principal do intervalo útil de potencial do eléctrodo no solvente utilizado, e da qualidade e pureza do material. O carbono existe em diversas formas condutoras. As reacções electroquímicas são

normalmente mais lentas no carbono do que nos eléctrodos metálicos, a cinética da transferência electrónica sendo dependente da estrutura do material e da preparação da superfície. O carbono tem uma grande actividade superficial, o que explica a sua susceptibilidade ao bloqueamento do eléctrodo por compostos orgânicos. Na superfície de carbono podem ser realizadas ligações com hidrogénio, grupos hidroxilo e carbonil, o que significa que o comportamento desses eléctrodos pode ser sensível ao pH [318].

Diversos tipos de carbono são utilizados como eléctrodos. Estes incluem carbono vítreo, fibras de carbono, carbono negro, e várias formas de grafite e de pasta de carbono, constituído por partículas de grafite em contato incorporadas numa matriz inerte. Todos estes tipos de carbono são de configuração sp^2 .

Nos estudos electroquímicos provavelmente o mais utilizado é o carbono vítreo, que é isotrópico. Mas o carbono vítreo não deve ser confundido com carbono amorfo. A IUPAC afirma: " O carbono de tipo vítreo não pode ser descrito como carbono amorfo porque é constituído por elementos estruturais bi-dimensionais e não apresenta ligações pendentes" [323]. Devido à sua dureza e fragilidade, a fabricação dos eléctrodos de carbono vítreo é difícil. A fabricação consiste na carbonização por aquecimento de polímeros fenol / formaldeído ou de poliacrilonitrilo entre 1000 e 3000 °C e sob pressão. O carbono vítreo é impermeável à líquidos e gases, fácil de polir e compatível com todos os solventes comuns. Estas propriedades têm conduzido à sua utilização generalizada na electroquímica para determinar o mecanismo de várias reacções e na análise voltamétrica.

A resistência do carbono vítreo é suficientemente baixa para ser insignificante na maioria das aplicações electroanalíticas. A estrutura de poros desconexos impede a entrada de solvente, mas foi descrita a inserção pouco profunda de iões de electrólito nos poros localizados na superfície do eléctrodo. As cavidades ocasionais, originadas pela formação de bolhas de gás durante o tratamento térmico, cobrem uma pequena fração da área do eléctrodo e não parecem afectar significativamente a resposta electroquímica. A rugosidade da superfície depende assim da técnica de preparação, e foram relatados factores de rugosidade no intervalo de 1,3 a 3,5, [324, 325]. Nódulos com diâmetros de 50 a 300 nm foram também observados por microscopia

electrónica de varrimento (SEM) e microscopia de túnel de varrimento (STM), com uma contribuição adicional à rugosidade da superfície [324].

A capacitância observada após o tratamento térmico do carbono vítreo é bastante baixa, $10 - 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Este é o que mais se aproxima do valor para uma dupla camada clássica, sem o carácter anómalo de semi-metal do eléctrodo. Para a grande maioria dos eléctrodos de carbono vítreo polidos, a capacitância observada é maior, variando de 30 à $70 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Parte deste aumento deve-se à rugosidade, mas também aos processos superficiais faradaicos ou de adsorção. A corrente basal do carbono vítreo é geralmente maior do que nos compósitos de grafite, porque toda a superfície é activa. Embora a capacitância observada para o carbono vítreo seja geralmente maior do que para a Pt, a oxidação do carbono é cineticamente lenta, e o intervalo anódico do carbono vítreo é significativamente mais positivo do que da Pt. Esta propriedade tornou o carbono vítreo num eléctrodo atractivo para os estudos de oxidação, particularmente em soluções aquosas [320].

1.5.3 Técnicas de voltametria

A voltametria [318] consiste na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação de um potencial ao eléctrodo origina uma corrente faradaica, I_f - directamente relacionada à transferência de carga, e uma corrente capacitiva, I_C - necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada. A corrente total registada é:

$$I_t = I_C + I_f$$

Em cada experiência voltamétrica o potencial aplicado, tal como a corrente medida, variam com o tempo. A curva de corrente em função de potencial, $I = I(E)$, que é registada no decorrer de um ensaio voltamétrico é designada por voltamograma. A variação do potencial com o tempo é designada por velocidade de varrimento, v . A corrente registada mede a velocidade da reacção electroquímica que ocorre na região interfacial entre o eléctrodo e a solução e dá informações sobre o mecanismo de reacção electroquímica. Dos métodos disponíveis para estudar os processos de eléctrodo, os métodos de varrimento de potencial são provavelmente os mais usados.

As técnicas de varrimento de potencial têm sido utilizadas para identificar as espécies presentes em solução, para obter dados qualitativos e quantitativos e para estudar a natureza e os mecanismos das reações electroquímicas que ocorrem no sistema [326, 327]. A análise e a interpretação dos voltamogramas permite a determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

No presente trabalho foram empregues três técnicas de voltametria: a voltametria cíclica (CV - “cyclic voltammetry”), a voltametria de pulso diferencial (DPV - “differential pulse voltammetry”), e a voltametria de onda quadrada (SWV - “square wave voltammetry”).

1.5.3.1 Voltametria cíclica (CV)

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre as reações electroquímicas. Esta técnica é muitas vezes a primeira experiência realizada num estudo electroanalítico devido à sua capacidade de fornecer rapidamente informações consideráveis sobre a cinética das reações de transferência de electrões e sobre as reações químicas acopladas ou processos de adsorção. Em particular, a voltametria cíclica oferece uma rápida localização dos potenciais redox da espécie electroativa, e uma avaliação imediata do efeito do meio sobre o processo redox.

Nesta técnica, o potencial aplicado ao eléctrodo varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante $v = dE/dt$ entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f), previamente escolhidos, **Fig. 1.28**. Após o início do varrimento de potencial, quando se atinge o valor E_{max} o sentido do varrimento é invertido e é varrido até E_{min} , e assim sucessivamente, de uma forma cíclica que dá o nome à técnica. O sentido de varrimento de potencial pode ser positivo ou negativo.

Para uma reacção descrita pela equação $O + ne^- \rightarrow R$, só com espécies O inicialmente presentes na solução, durante o varrimento são geradas electroquimicamente espécies R, quando o potencial aplicado se torna suficientemente “negativo”. Esta redução é acompanhada por uma corrente catódica cujo valor aumenta até que a concentração de O é praticamente zero. Neste instante, a corrente começa a diminuir com a conversão de O para R.

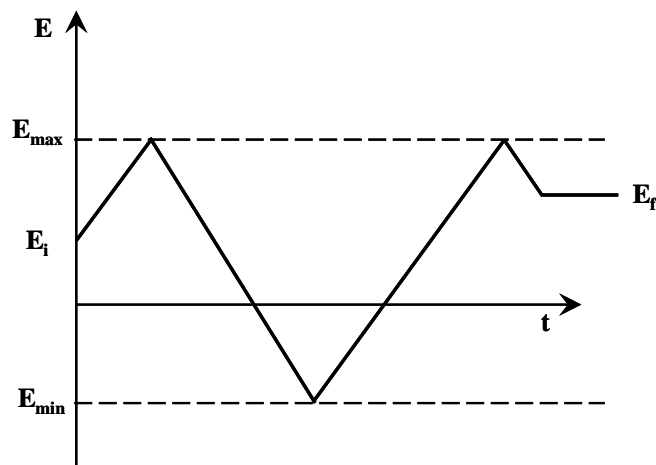


Figura 1.28 – Representação esquemática da aplicação de potencial com o tempo em voltametria cíclica; E_i – potencial inicial, E_f – potencial final, E_{\max} – potencial máximo, E_{\min} – potencial mínimo [318].

Após a inversão da direcção do varrimento para o sentido positivo, as espécies R são oxidadas de volta para O, conforme indicado pela corrente anódica [328]. Assim, a voltametria cíclica é capaz de gerar rapidamente uma nova espécie durante o varrimento e, em seguida, analisar a espécie gerada no varrimento em sentido contrario, um aspecto muito importante desta técnica [320].

Na voltametria cíclica, os parâmetros importantes que permitem a caracterização do processo de eléctrodo são: o potencial do pico anódico (E_{pa}), a intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa}), o potencial de pico catódico (E_{pc}) e a intensidade máxima de corrente que resulta da reacção de redução ou pico de corrente catódica (I_{pc}), **Fig. 1.29**. As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reacção de transferência de carga e com a concentração da espécie electroactiva em solução que sofre essa reacção.

Existem várias relações entre os parâmetros definidos e a velocidade de varrimento de potencial que fornecem informações de natureza termodinâmica e cinética, que permitem caracterizar o sistema. Um par redox na qual ambas espécies trocam rapidamente electrões com o eléctrodo de trabalho é denominado como par electroquimicamente reversível.

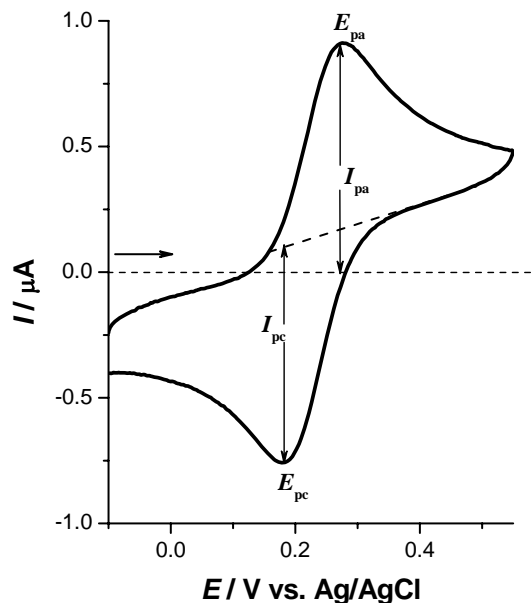


Figura 1.29 – Voltamograma cíclico para um sistema reversível.

As condições necessárias para diagnosticar um sistema reversível através de voltametria cíclica são:

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

A irreversibilidade electroquímica é causada pela lentidão da troca de electrões das espécies redox com o eléctrodo de trabalho. Se as condições acima mencionadas não são verificadas, o sistema pode ser considerado como quasi-reversível ou irreversível. A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e o valor da razão I_{pa}/I_{pc} torna-se diferente de 1. Verifica-se ainda, em comparação com o caso reversível, uma diminuição das correntes de pico e uma maior separação entre picos anódicos e catódicos.

Para um sistema irreversível o voltamograma cíclico apresenta picos de corrente que não têm associados picos inversos no varrimento em sentido oposto. Os critérios para identificar um sistema irreversível são:

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

sendo n' o número de electrões transferidos no passo determinante da velocidade, e α o coeficiente de transferência de carga electroquímica. Para um sistema quasi-reversível a cinética das reacções de oxidação e de redução tem de ser considerada simultaneamente. A solução matemática é mais complexa, contudo, há soluções teóricas numéricas.

As espécies adsorvidas levam a mudanças na forma do voltamograma cíclico, uma vez que elas não precisam difundir para a superfície do eléctrodo. Em particular, se só as espécies adsorvidas são oxidadas ou reduzidas, **Fig. 1.30**, no caso de uma cinética rápida o voltamograma cíclico é simétrico, com o potencial dos picos de oxidação e redução coincidentes [329].

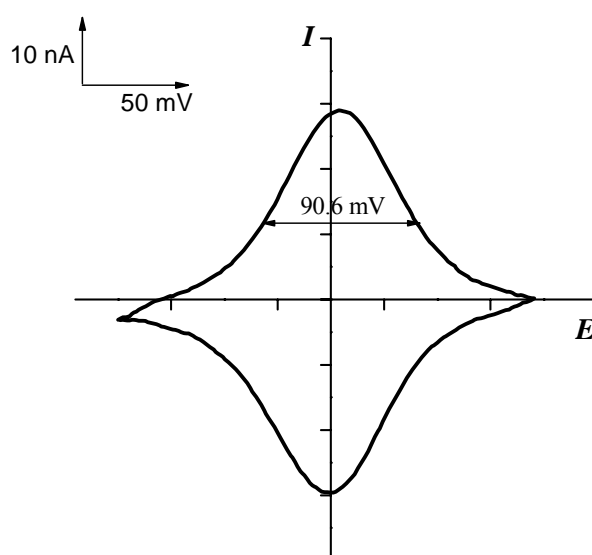


Figura 1.30 – Voltamograma cíclico para P_{glivec} adsorvido na superfície do carbono vítreo em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Velocidade de varrimento 25 mV s^{-1} [329].

No caso da adsorção de um reagente ou de um produto de uma reacção de eléctrodo, a forma da curva voltamétrica é modificada e podem ocorrer duas situações distintas:

- (i) a velocidade de reacção das espécies adsorvidas é muito maior do que a das espécies em solução, então considera-se apenas a reacção das espécies adsorvidas;
- (ii) é necessário considerar as reacções tanto as espécies adsorvidas, como das que se encontram em solução.

Na **Fig. 1.30** está representado o voltamograma cíclico de uma reacção reversível em que só as espécies adsorvidas O e R contribuem para a reacção total. A curva corrente-potencial para a espécie O adsorvida inicialmente e para uma cinética de eléctrodo rápida é dada por:

$$I_{pa} = nFA\nu\Gamma / 4RT$$

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

Esta equação é válida só para velocidades de varrimento inferiores a 10 mV s^{-1} , e a partir dela pode calcular-se, para sistemas reversíveis, que a largura a meia altura do pico de corrente é $W_{1/2} = 90,6/n \text{ (mV)}$, o que permite determinar o número de electrões transferidos.

Com o aumento da velocidade de varrimento, o sistema perde a sua reversibilidade e a curva corrente-potencial não continua simétrica devido a um afastamento progressivo dos picos, anódico e respectivamente catódico. Nesta situação é possível determinar a constante de velocidade padrão, k_0 , utilizando a equação:

$$k_0 = (\alpha n)Fv_c / RT$$

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

Um sistema electroquímico pode apresentar vários picos anódicos e catódicos se houver diferentes passos na mesma reacção ou uma outra reacção electroquímica. O aparecimento e a posição dos picos seguintes são dependentes da facilidade desta segunda reacção electroquímica em relação a primeira, e não é sempre fácil obter a resolução do mecanismo. No entanto, através da escolha do intervalo de potencial ou dos potenciais de inversão do varrimento, é possível identificar os picos que aparecem no varrimento inverso ou nos varrimentos seguintes, e relacioná-los com os que ocorrem no varrimento inicial. A partir destas informações, um mecanismo redox para uma espécie dada pode ser proposto.

1.5.3.2 Voltametria de impulso diferencial (DPV)

A base de todas as técnicas de impulso é a diferença na velocidade de decaimento das correntes capacitivas e faradaicas depois de se aplicar um degrau de potencial (ou "impulso"). Um degrau na aplicação de um potencial ou corrente representa uma modificação instantânea do sistema electroquímico. A análise da evolução do sistema após a perturbação permite avaliar as reacções no eléctrodo e a velocidade de reacção.

Depois da aplicação de um impulso de potencial, a corrente capacitiva decai exponencialmente com o tempo, enquanto que a corrente de origem faradaica, proveniente da reacção electroquímica decai a uma velocidade inferior, proporcional a $1/t^{1/2}$, a corrente total sendo medida no final do impulso. Este tipo de amostragem tem a vantagem de um aumento na sensibilidade e melhores características para aplicações analíticas. Em eléctrodos sólidos [318], há uma vantagem adicional de discriminação contra o bloqueamento do eléctrodo por adsorção.

A técnica de voltametria de impulso diferencial, **Fig. 1.31A**, mede a diferença entre duas correntes depois de aplicar impulsos de potencial sucessivos com uma amplitude de impulso ΔE_p em intervalos periódicos de tempo τ . O potencial base é incrementado entre os impulsos, resultando uma rampa ou escada de potencial, com o valor do incremento sendo sempre o mesmo, ΔE_s . A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso, I_1 , e no final do impulso, I_2 , e a diferença entre as duas correntes é registrada, **Fig. 1.31B**.

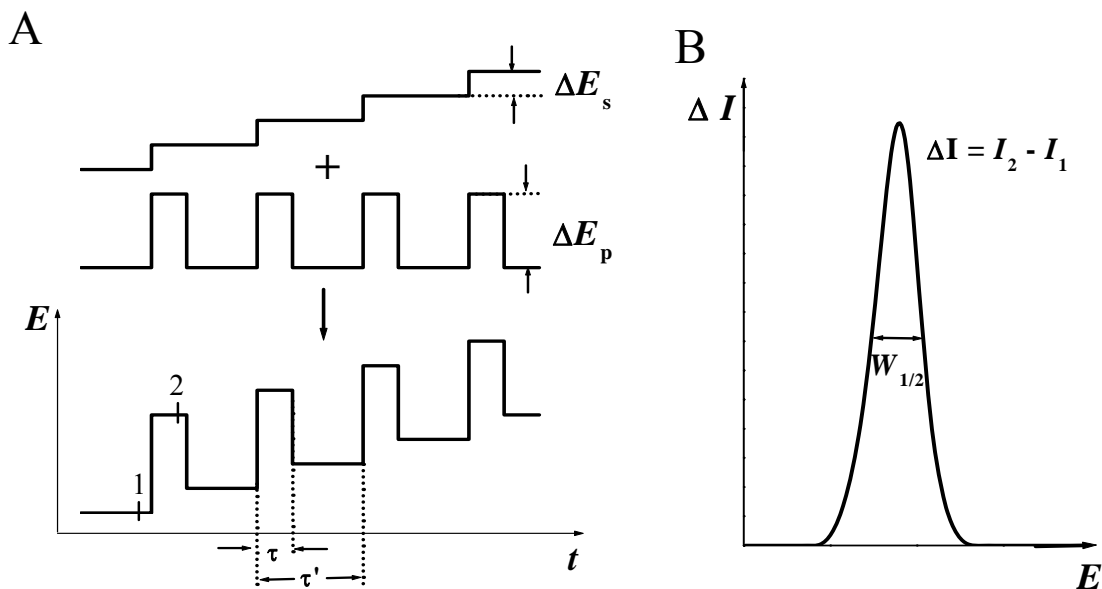


Figura 1.31 - A) Esquema de aplicação de potenciais; **B)** Resposta típica [318].

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

Como esta técnica é um método diferencial, a resposta é semelhante à da primeira derivada de um voltamograma convencional [318], ou seja, um pico. O potencial do pico, E_p , pode ser identificado com o $E_{1/2}$ para um sistema reversível, mas com o aumento da irreversibilidade o E_p afasta-se do $E_{1/2}$, e ao mesmo tempo a largura do pico aumenta e a sua altura diminui.

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

1.5.3.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)

Com avanços na instrumentação, a voltametria de onda quadrada (SWV - “square wave voltammetry”) tornou-se uma importante técnica analítica. Nesta técnica o potencial aplicado é constituído por uma onda quadrada de amplitude constante ΔE_p sobreposta a uma escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s e com um período τ , **Fig. 1.32A**, [318, 330]. Durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eléctrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, a aplicação de um impulso de potencial negativo.

A corrente é medida antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, após cada metade do ciclo. A corrente total, ΔI ou I_t que é registada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial directo – corrente directa (I_f - “forward current”), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – corrente inversa (I_b - “backward current”), com a corrente $I(2)$ de sinal contrário a corrente $I(1)$. Esta diferença de correntes é mostrada como uma função do potencial aplicado, **Fig. 1.32B**, e dela resulta que, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$.

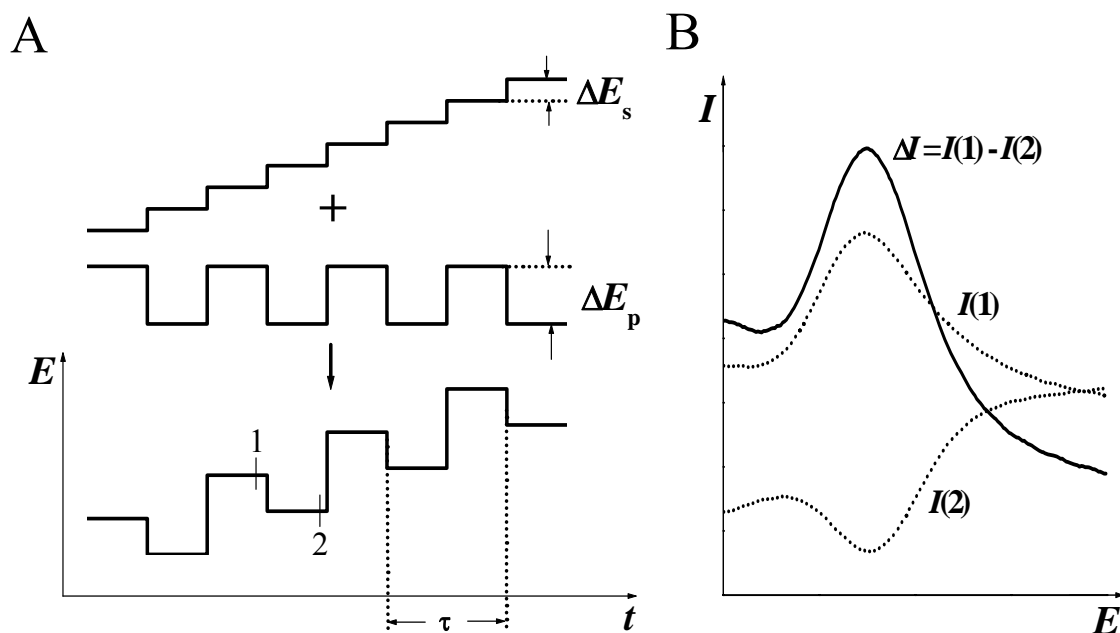


Fig. 1.32– A) Esquema de aplicação de potenciais; B) Resposta típica [318].

A maior sensibilidade apresentada pela voltametria de onda quadrada relativamente a voltametria de impulso diferencial, no caso de sistemas reversíveis, resulta do tipo de amostragem e tratamento da corrente apresentado acima. A técnica também permite uma maior rapidez de análise, sendo possível utilizar velocidades de varrimento efectivas da ordem de $1,0 \text{ V s}^{-1}$, o que diminui o consumo das espécies a analisar e elimina praticamente o bloqueamento da superfície do eléctrodo.

Uma vez que a corrente é amostrada em ambos os sentidos, positivo e negativo, as correntes correspondentes à oxidação ou redução da espécie electroactiva na superfície do eléctrodo podem ser obtidas na mesma experiência, e por subtração a sua diferença. Outra vantagem, que resulta da subtração das correntes, é o facto de permitir a realização de determinações electroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra, tornando a análise menos morosa e menos dispendiosa.

Em termos conceptuais, as técnicas de DPV e SWV são muito semelhantes [318]. A voltametria de onda quadrada pode ser considerada como um caso especial de uma onda de impulso diferencial, com o intervalo entre os impulsos igual à largura do impulso. A diferença importante consiste no facto que o potencial base, à qual a corrente está registrada no voltamograma, está deslocado na direção de varrimento com $\left| \frac{\Delta E}{2} \right|$ no caso da voltametria de impulso diferencial.

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL

Neste capítulo descrevem-se os materiais e os reagentes utilizados, a célula electroquímica, os instrumentos de medida, o tratamento dos dados, as metodologias envolvidas na modificação da superfície de eléctrodo e as condições experimentais utilizadas ao longo deste trabalho.

2.1 Reagentes e soluções

Todos os compostos, Tabela 2.1, foram utilizados sem purificação adicional. As soluções padrão de cada uma das substâncias e todas as soluções tampão foram preparadas em água purificada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas no texto e foram obtidas na célula electroquímica através da diluição da respectiva substância no electrólito desejado. As soluções padrão foram armazenadas no frigorífico a 4°C .

As soluções padrão dos sais de paládio foram preparadas nos ácidos correspondentes: $0,1 \text{ M PdCl}_2$ em 3 M HCl e $0,085 \text{ M PdSO}_4$ em $3 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. As soluções foram lentamente aquecidas sob agitação contínua a fim de garantir uma completa dissolução, e seguidamente foram armazenadas à temperatura ambiente. A solução padrão de $0,5 \text{ M Pd(NO}_3)_2$ em $1,8 \text{ M HNO}_3$ foi utilizada de imediato. As soluções padrão de $0,2 \text{ M K}_2\text{PdCl}_4$ foram preparadas directamente em tampão acetato $0,1 \text{ M pH } 4,5$ ou em tampão fosfato $0,1 \text{ M pH } 7,0$.

No caso do ácido lipóico a solução padrão foi preparada em água /etanol 1:1.

Soluções padrão de ADN dupla hélice (dsDNA), proveniente do timo de vitela (calf thymus), foram preparadas em água desionizada e a concentração foi determinada por espectrofotometria: $1 \text{ u } A_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ dsDNA}$.

As soluções padrão no caso da espermina, a espermidina e os complexos de paládio das mesmas foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

Tabela 2.1 – Reagentes e as concentrações das soluções padrão utilizadas

Substância	Abreviatura	Concentração	Proveniência
PdCl ₂	—	0,1 M	Sigma-Aldrich
PdSO ₄	—	0,085 M	Sigma-Aldrich
Pd(NO ₃) ₂	—	0,5 M	Sigma-Aldrich
K ₂ PdCl ₄	—	$2 \times 10^{-3} \text{ M}$	Sigma-Aldrich
Ácido lipóico	LA	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	Sigma-Aldrich
Paládio-ácido lipóico	Pd-LA	10^{-2} M	Garnett McKeen Laboratory, Inc. USA
Poly-MVA	—	n/a	Garnett McKeen Laboratory, Inc. USA
Solgar Alpha Lipoic Acid	Solgar-ALA	60 mg / cápsula	Solgar Vitamin and Herb, Leonia, New Jersey
Espermina	Sp	$50 \mu\text{g ml}^{-1}$	Sigma-Aldrich
Espermidina	Spd	$50 \mu\text{g ml}^{-1}$	Sigma-Aldrich
Paládio-espermina	Pd(II)-Sp	0,1 M	Research Unit “Molecular Physical-Chemistry”, Coimbra, Portugal
Paládio-espermidina	Pd(II)-Spd	0,1 M	Research Unit “Molecular Physical-Chemistry”, Coimbra, Portugal
dsDNA	—	n/a	Sigma-Aldrich

As soluções tampão de electrólito de suporte de diferentes valores de pH, com força iónica igual a 0,1 M, foram preparadas em conformidade com a **Tabela 2.2**, a partir de reagentes de pureza analítica.

Tabela 2.2 - Composição das soluções de electrólito de suporte.

Electrólito de Suporte				pH
Diluições		de para	100 ml	
0,2 M	KCl (25 ml)	+	0,2 M HCl (42.5 ml)	1,4
0,2 M	KCl (25 ml)	+	0,2 M HCl (6.5 ml)	2,0
0,2 M	NaOAc (3.7 ml)	+	0,2M HAcO (46.3 ml)	3,1
0,2 M	NaOAc(13.2 ml)	+	0,2M HAcO (36.8 ml)	4,1
1,0 M	NaOAc (7.2 ml)	+	1,0 M HAcO (12.5 ml)	4,5
0,2 M	NaOAc (41.2 ml)	+	0,2 M HAcO (8.8 ml)	5,5
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (6.15 ml)	+	0,2 M NaH ₂ PO ₄ (43.85 ml)	6,1
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (30.5 ml)	+	0,2 M NaH ₂ PO ₄ (19.5 ml)	7,0
0,2 M	Na ₂ HPO ₄ (47.35 ml)	+	0,2 M NaH ₂ PO ₄ (2.65 ml)	8,0
2,0 M	NH ₃ (3 ml)	+	2,0 M NH ₄ Cl (7 ml)	9,0
2,0 M	NH ₃ (9 ml)	+	2,0 M NH ₄ Cl (1 ml)	10,6
0,2 M	KCl (25 ml)	+	0,2 M NaOH (6 ml)	12,0

A determinação do valor de pH das soluções foi efectuada à temperatura de 25 °C, utilizando o medidor de pH Crison 21, Crison Instruments S.A., Barcelona, Espanha, com um eléctrodo de vidro combinado Crison.

Para dosear os volumes de solução preparados e utilizados ao longo das experiências, foram usadas pipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P20 da Gilson

S.A., Villiers-le-Bel, França, e micropipetas computadorizadas EP-100 e EP-10 Plus da Rainin Instruments Co. Inc., Woburn, USA.

As soluções saturadas com N₂ foram preparadas pela passagem do fluxo de gás de elevada pureza através das soluções durante 10 minutos antes do início do ensaio voltamétrico. Durante o ensaio um fluxo do gás foi mantido sobre as soluções.

2.2 Instrumentação

As medidas de voltametria foram efectuadas utilizando um potencióstato/galvanostato Autolab, da Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciostático, **Fig. 2.1**.



Figura 2.1 – Imagem do potenciostato Autolab

O controlo dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos, foi efectuado por intermédio do software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda.

Para as medidas voltamétricas por voltametria cíclica (CV) foi sempre utilizado um degrau de potencial $\Delta E_s = 2$ mV. Em todos os ensaios realizados em voltametria de impulso diferencial (DPV), foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: largura do impulso a 70 ms, amplitude de impulso a 50 mV e velocidade de varrimento $v = 5$ mV s⁻¹. Durante as medidas por voltametria de onda quadrada (SWV) foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: o degrau de potencial a $\Delta E_s = 2$ mV e a amplitude de impulso a 50 mV. A frequência do impulso foi modificada em função da experiência efectuada. Alguns CV ou DPV foram previamente sujeitos à

subtracção com o voltamograma obtido nas mesmas condições mas só em solução de electrólito de suporte. Outros DPV foram sujeitos à correcção de linha de base através de um algoritmo matemático “moving average” utilizando um degrau de 1 mV. Quando usadas outras condições, elas serão devidamente referidas no texto.

No decorrer de todas as experiências do trabalho experimental, os ensaios foram efectuados numa célula electroquímica de um único compartimento com uma capacidade volumétrica máxima de 2 ml, **Fig. 2.2**. Utilizou-se como eléctrodo de trabalho um eléctrodo de carbono vítreo - GCE ($\Phi = 1,5$ mm). O eléctrodo de referência foi um eléctrodo Ag/AgCl e o eléctrodo auxiliar um fio de platina. Todas as medidas experimentais foram efectuadas à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C.

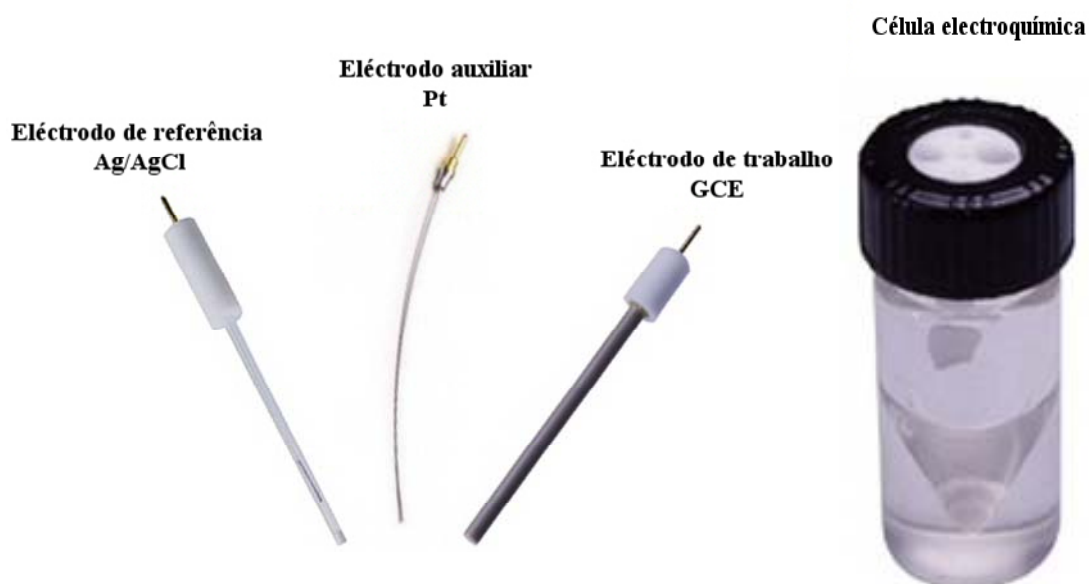


Figura 2.2 – Imagem da célula electroquímica e dos eléctrodos utilizados nos estudos electroquímicos.

Todos os gráficos e figuras de voltamogramas foram efectuadas utilizando o software ORIGIN versão 6.0 da Microcal Software, Inc., USA. O algoritmo de Savitsky-Golay foi utilizado sempre que houve necessidade de eliminar ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

Os programas CHEMDRAW ULTRA e CHEM3D ULTRA, versão 8.0, de Cambridge Soft Corporation, foram utilizados para desenhar as estruturas das moléculas.

As medidas espectrofotométricas, utilizadas para a determinação de concentração das soluções de ADN, foram executadas utilizando um espectrofotómetro UV-VIS SPECORD S 100 da Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha.

2.3 Condições experimentais

As soluções utilizadas ao longo deste trabalho foram obtidas por diluição directa da respectiva solução padrão, **Tabela 2.1**, no electrólito de suporte desejado. As concentrações e os electrólitos de suporte utilizados estão referidos no texto. Todavia, existem alguns procedimentos especiais que vão ser descritos.

2.3.1 Preparação da superfície do GCE

Antes de cada utilização a superfície do eléctrodo de trabalho foi limpa mecanicamente e electroquimicamente. A limpeza mecânica do GCE envolve o polimento sequencial com spray de grão de diamante de vários tamanhos, de 6 a 1 μm , numa placa de polimento, seguida dum lavagem com água desionizada. Depois desta limpeza mecânica o eléctrodo é colocado na célula electroquímica, com o electrólito de suporte a ser utilizado, e são efectuados vários varrimentos de potencial entre valores pré-determinados até a resposta voltamétrica permanecer estável, comprovando-se assim a limpeza da sua superfície.

2.3.2 Modificação da superfície do GCE com ADN

Durante o estudo da interacção entre o Pd^{2+} , Pd-LA, *Poly-MVATM*, Pd(II)-Sp, Pd(II)-Spd, espermina e espermidina e o ADN, o eléctrodo de carbono vítreo foi modificado pela imobilização de ADN na sua superfície, conduzindo à construção de um biossensor com ADN. A modificação superficial do eléctrodo de carbono vítreo com ADN consiste na imobilização de ADN na superfície do GCE, previamente limpa e condicionada em electrólito de suporte. Dependente da concentração da solução de

ADN e do método de imobilização, por deposição mecânica ou electrodeposição, foram obtidos vários tipos de eléctrodos modificados. A aplicação de um método de imobilização ou do outro depende do uso final do eléctrodo modificado e da sua interacção com as espécies e analitos utilizados.

Filme de dsDNA. O GCE modificado com um filme de dsDNA é obtido depositando na sua superfície um volume determinado numa solução de dsDNA em tampão acetato 0,1 M pH 4,5. Após a secagem desta primeira camada de dsDNA, o mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes. A operação deixa a superfície coberta com um filme de ADN cuja espessura varia com o grau de hidratação. Este procedimento foi utilizado para avaliar as interacções de curta duração de vários compostos com o ADN, sendo que o filme multicamada de dsDNA garante que o sinal electroquímico é devido apenas ao ADN modificado e não a adsorção não-específica do composto.

Monocamada de dsDNA. O GCE modificado com uma monocamada de dsDNA é obtido pela deposição de uma única gota de 5 μ l de dsDNA e a adsorção espontânea do mesmo por 10 minutos. Após a modificação, o eléctrodo foi lavado com um jacto de água desionizada para assegurar a remoção das moléculas não adsorvidas.

Filme fino de dsDNA. A imobilização do dsDNA na superfície do GCE é realizada por electrodeposição, aplicando um potencial de + 0,30 V durante 300 s numa solução de dsDNA (de várias concentrações). O potencial escolhido, + 0,30 V vs. Ag / AgCl, foi seleccionado para reforçar a adsorção de ADN na superfície do eléctrodo, mas está abaixo do potencial de oxidação das bases do ADN ou do produto de oxidação de qualquer base [64].

Os últimos dois procedimentos foram utilizados também para a imobilização do ADN a partir de soluções incubadas com vários compostos, para uma avaliação directa da interacção dos mesmos com o ADN após longos tempos de incubação.

2.3.3 Procedimentos experimentais

Após a limpeza do eléctrodo realiza-se a medição voltamétrica das espécies que se pretendem estudar. A diluição do composto foi efectuada na própria célula

electroquímica a partir da solução padrão. A escolha do electrólito de suporte e a concentração da solução foi estudada para cada caso. Aplicaram-se as técnicas de voltametria cíclica, impulso diferencial e de onda quadrada nas condições indicadas anteriormente. Depois de cada técnica limpou-se a superfície do eléctrodo para retirar o composto que poderia ter ficado adsorvido, ou os possíveis produtos de oxidação das espécies estudadas, de maneira a não influenciar o primeiro varrimento da técnica a seguir.

No caso das interações com o ADN, soluções de controle de dsDNA foram preparadas no tampão escolhido para a interacção, armazenadas nas mesmas condições e analisadas após os mesmos períodos de tempo que as soluções incubadas.

No caso dos eléctrodos modificados com ADN foram sempre realizadas experiências de controle com os biossensores de dsDNA seguindo as mesmas etapas que as usadas para o estudo da interacção com os compostos de interesse.

2.4 Análise das amostras comerciais

Neste trabalho foram analisadas duas amostras comerciais, sendo estas amostras suplementos nutricionais, o suplemento líquido *Poly-MVA™*, e suplementos antioxidantes, cápsulas de *Solgar-ALA* vegetal e o *Poly-MVA™*.

Tanto para as experiências de caracterização voltamétrica e determinação analítica do ácido lipóico (*Solgar-ALA* e *Poly-MVA™*) como também para as experiências de interacção com o ADN (*Poly-MVA™*), utilizando os métodos de modificação do eléctrodo acima mencionados, não foi necessário uma preparação especial das amostras.

No caso do suplemento nutricional *Poly-MVA™* as amostras foram directamente adicionadas à solução tampão resultando num factor de diluição da amostra de 50 para a determinação do ácido lipóico.

O conteúdo das cápsulas *Solgar-ALA* foi dissolvido em água / etanol 1:1 e a solução foi agitada mecanicamente utilizando um agitador para uma melhor solubilidade. A solução foi então filtrada para remover o estearato de magnésio

(não solúvel) utilizado como agente antiaglomerante. A solução límpida foi utilizada para a determinação do ácido lipóico misturando-o com a solução de electrólito de suporte, com um factor de diluição da amostra de 50.

Para a determinação analítica do ácido lipóico nos suplementos mencionados utilizou-se o método de adição de padrão para minimizar o efeito de matriz. A validação dos resultados obtidos por voltametria foi realizada através do cálculo do valor de recuperação aparente [281]. A análise das amostras foi realizada não sendo necessária a remoção do oxigénio.

CAPÍTULO 3

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO PALÁDIO E DA INTERACÇÃO COM O ADN

Neste capítulo é feita uma caracterização sistemática do comportamento electroquímico do paládio e dos processos envolvidos nas reacções redox das nanoestruturas de paládio eletrodepositadas em eléctrodos de carbono. A caracterização foi realizada por técnicas de voltametria cíclica, de onda quadrada e de impulso diferencial, de maneira a permitir esclarecer o mecanismo de formação de diversas nanoestruturas, com respeito a vários parâmetros de electrodeposição.

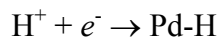
Será também apresentado um estudo da interacção do Pd^{2+} com o ADN, utilizando eléctrodos de carbono modificados com dsDNA, para detectar possíveis mudanças conformacionais e/ou danos oxidativos causados ao ADN.

3.1 Introdução

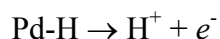
O comportamento electroquímico do paládio em meio aquoso é complexo e estão envolvidas várias reacções, entre estas as mais importantes são: a redução da espécie de Pd^{2+} para paládio metal, adsorção e absorção de hidrogénio molecular, adsorção e absorção de oxigénio, formação de óxidos e a dissolução do metal [182].

Devido à habilidade do paládio de absorver hidrogénio molecular [177, 178] o sistema hidrogénio-paládio é um importante tópico de interesse com grandes implicações práticas. A absorção de hidrogénio leva a formação de hidretos, processo de particular interesse na aplicação do paládio como material de armazenamento de hidrogénio.

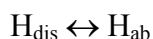
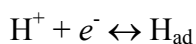
Nas experiências de electroquímica, quando o eléctrodo funciona como cátodo, os iões de hidrogénio na solução são reduzidos a hidrogénio molecular, que é absorvido pelo eléctrodo de (ou modificado com) paládio:



Quando o eléctrodo funciona como ânodo, o hidrogénio absorvido é oxidado e os iões de hidrogénio são libertados para o electrólito de suporte:



É considerado [183] que a dissolução e absorção do hidrogénio no paládio procede da seguinte forma:



onde H_{ad} são os átomos de hidrogénio adsorvido, H_{dis} são os átomos de hidrogénio dissolvido imediatamente por debaixo da superfície, e o H_{ab} é o hidrogénio adsorvido nas primeiras camadas de átomos de paládio. Os átomos de hidrogénio, pelo seu pequeno tamanho, têm uma elevada mobilidade dentro da rede do paládio e difundem rapidamente através do metal. De maneira semelhante [186], a oxidação do paládio procede num mecanismo em três etapas:

- o oxigénio adsorvido na superfície do paládio é dissociado e forma oxigénio chemiabsorvido e óxidos na superfície;
- o oxigénio atómico difunde através da camada fina de óxidos na superfície no paládio metal;
- a formação de PdO, quando uma concentração crítica de oxigénio foi atingida na região imediatamente debaixo da superfície.

Foi sugerido que os iões de Cl^- ou de HSO_4^- [182], quando presentes nas soluções, podem ser implicados na formação de complexos intermediários na superfície do eléctrodo de Pd, de tipo $[\text{PdCl}]^-$ e $\text{PdO}(\text{HSO}_4)$, e que participam na dissolução do paládio.

3.2 Cloreto de paládio

3.2.1 A voltametria do paládio em solução

As reacções redox de paládio no GCE foram investigadas por voltamétrie cíclica numa solução de 0,1 mM PdCl₂ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturada com N₂. Os voltamogramas foram registados entre o limite de potencial positivo de + 1,40 V e limites de potencial negativo variáveis, com a velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O primeiro varrimento tem como origem o potencial de $E_i = 0,00 \text{ V}$ e segue no sentido positivo para o limite de potencial de $E_1 = + 1,40 \text{ V}$, onde foi invertido para os seguintes limites de potencial negativo: - 0,30, - 0,60, - 0,80 ou - 0,90 V, **Fig. 3.1**. Quando o varrimento chega aos limites de potencial negativo de -0,30 e -0,60 V, nenhuma reacção de transferência de carga foi observada nos primeiros dois voltamogramas registados.

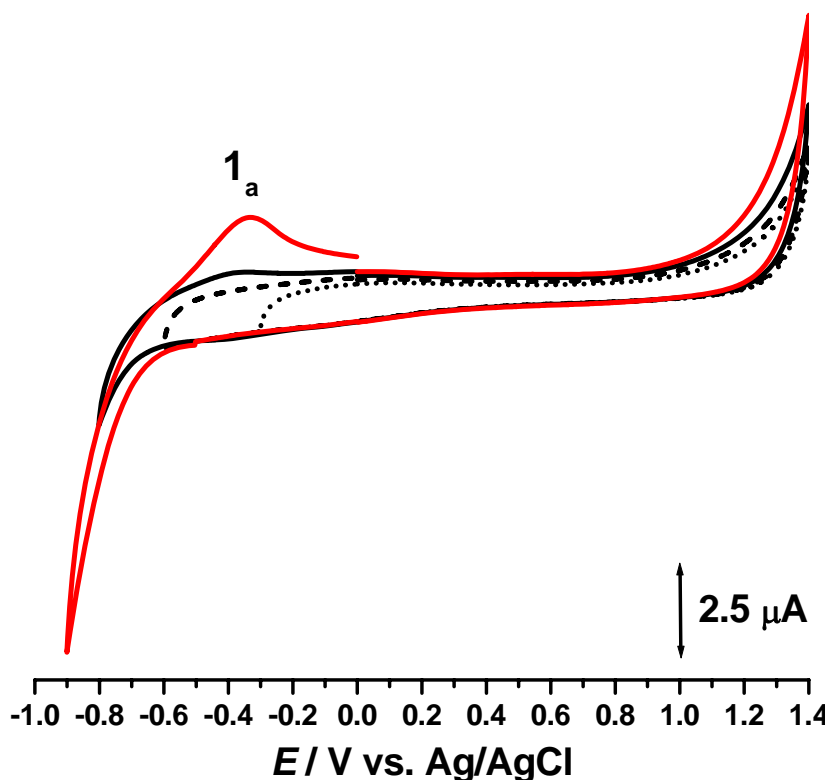


Figura 3.1 – Voltamogramas cíclicos sucessivos numa solução de 0,1 mM PdCl₂ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, entre o limite de potencial positivo de + 1,40 V e o limite de potencial negativo de: (•••) - 0,30, (---) - 0,60, (—) - 0,80 e (—) - 0,90 V.

Após ter atingido o limite do potencial de $-0,80$ V, ao inverter o varrimento para o sentido positivo, um pequeno pico 1_a ocorreu ao potencial $E_{pa}^1 = -0,35$ V. No voltamograma seguinte, o varrimento foi invertido a $-0,90$ V e observou-se o aumento da corrente do pico 1_a . Dessa forma, os voltamogramas registados mostram que o pico 1_a ocorre só após a aplicação de um potencial suficientemente negativo: $E \leq -0,80$ V.

Numa outra experiência, voltamogramas sucessivos foram registados na mesma solução entre $E_1 = +1,40$ V e $E_2 = -1,00$ V. No primeiro voltammograma obtido nestas condições, **Fig. 3.2**, observou-se apenas o pico de oxidação 1_a e nenhum pico catódico.

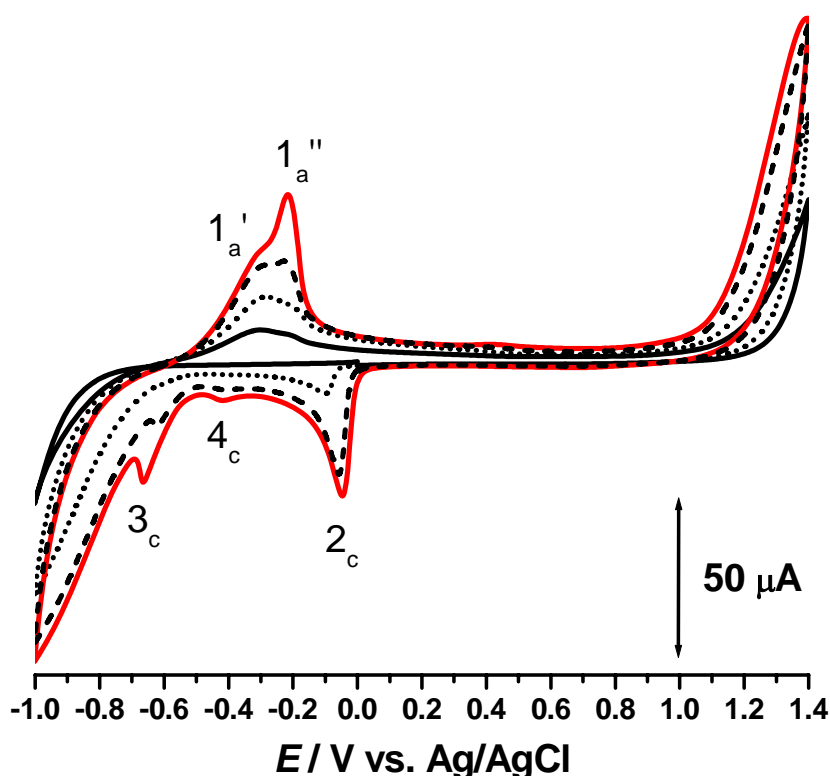


Figura 3.2 – Voltamogramas cíclicos numa solução de $0,1$ mM PdCl_2 em tampão fosfato $0,1$ M pH 7,0: (—) 1° , (•••) 2° , (---) 5° e (-.-) 10° varrimento.

No segundo varrimento, um pico catódico 2_c foi observado ao potencial $E_{pc}^2 = -0,10$ V. Varrimentos sucessivos levaram a um aumento considerável da corrente do pico 2_c , estabilizando-se após cinco varrimentos consecutivos.

No entanto, mais dois picos de redução 3_c e 4_c foram observados a potenciais mais negativos e com correntes menores. Além disso, após a inversão do varrimento no sentido positivo, foi observado que o pico 1_a agora corresponde a um pico de oxidação $1_a'$, $E_{pa}^{1'} = -0,31$ V, seguido para potenciais mais positivos por outro pico $1_a''$, $E_{pa}^{1''} = -0,21$ V.

Com o aumento do número de varrimentos, o pico anódico $1_a'$ tornou-se mais largo, enquanto o pico $1_a''$ se tornou mais alto e mais estreito. Foi também observado o aumento da corrente capacitiva para potenciais muito positivos e muito negativos com o aumento do número de voltamogramas registados.

Após varrimentos sucessivos registados numa solução de 0,1 mM PdCl_2 , o eléctrodo foi lavado com um jacto de água desionizada e transferido para o electrólito de suporte. Os varrimentos registados no intervalo de potencial $-1,00$ V $- +1,40$ V mostraram os mesmos picos observados na solução, **Fig. 3.3**, embora ligeiramente deslocados para potenciais mais negativos.

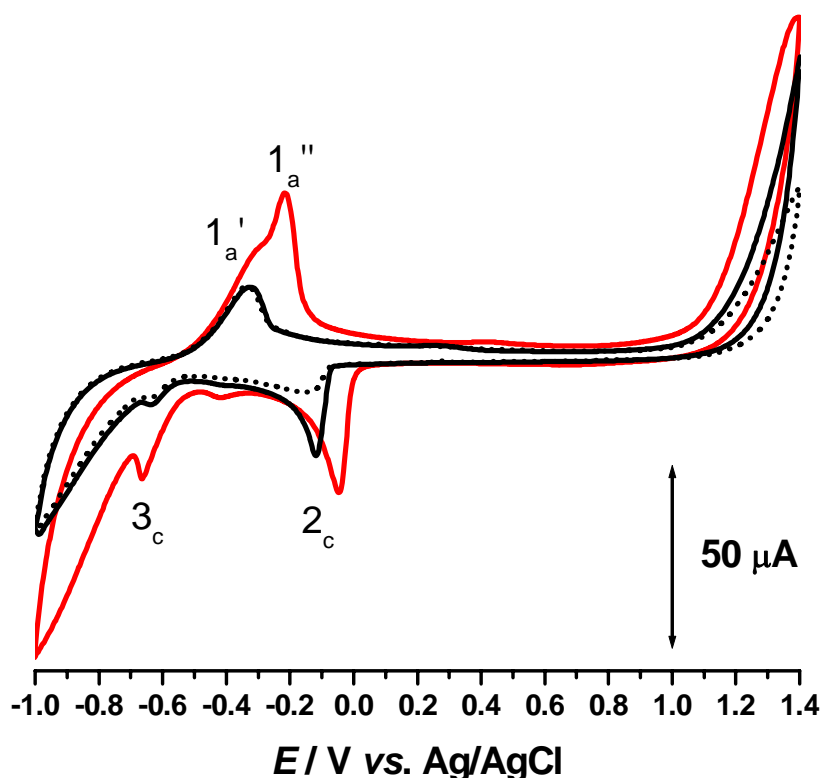


Figura 3.3 – Voltamogramas cíclicos: (—) 10º varrimento numa solução de 0,1 mM PdCl_2 , (—) 10º e (•••) 20º varrimento em tampão fosfato pH 7,0.

Foi também observado que as correntes dos picos diminuíram após a transferência do eléctrodo para o electrólito de suporte, mas ficaram constantes mesmo com o aumento do número de varrimentos realizados. Estes resultados sugerem que o paládio adsorve fortemente na superfície do eléctrodo, e foi de facto difícil ser removido, conseguindo-se uma superfície limpa só após várias etapas de polimento.

As experiências de voltametria cíclica utilizando um eléctrodo de carbono vítreo imerso numa solução de PdCl₂ mostram claramente a ocorrência de vários processos redox. Com base nos resultados já relatados na literatura [135, 143, 182, 183, 192], os picos observados estão relacionados com os diferentes estados de oxidação do paládio, Pd(0), Pd(II) e Pd(IV), que sofre várias reações redox, tais como a deposição de Pd(0), a oxidação do Pd(0) para o Pd(II) e o Pd(IV) que leva à formação de óxidos de paládio, e à redução dos mesmos.

Devido à complexidade dos processos redox que ocorrem na superfície do GCE e para obter informações sobre a origem destas reações redox, foram realizadas experiências complementares de microscopia de força atómica (AFM) [163], utilizando um eléctrodo de grafite pirolítica altamente orientada (HOPG), sendo que as experiências electroquímicas de controle utilizando qualquer um dos eléctrodos (HOPG e GCE) numa solução de PdCl₂ mostraram um comportamento voltamétrico semelhante.

A primeira abordagem foi analisar o paládio depositado no HOPG a partir de uma solução concentrada de 1 mM PdCl₂ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 após realizar cinco varrimentos no intervalo de potencial de -0,50 V a 0,00 V, vs. AgQRE [163], com uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Nas imagens de AFM, **Fig. 3.4A**, foram observados pequenos nanoaglomerados de Pd(0) com um arranjo linear na superfície de HOPG, demonstrando a predisposição das nanopartículas de metal em serem depositadas preferencialmente nos defeitos da superfície de eléctrodo [163].

Aumentando o número de varrimentos consecutivos para 15 voltamogramas, não foram observadas diferenças significativas na distribuição de nanopartículas na superfície do eléctrodo. No entanto, as dimensões dos núcleos tridimensionais aumentaram de 12 – 26 nm a 25 – 40 nm de altura e 120 – 150 nm de largura a meia

altura. Quando os varrimentos foram efectuados no intervalo de potencial de $-0,50$ V a $+0,90$ V, **Fig. 3.4B**, as nanoestruturas de paládio foram depositadas tanto nos defeitos do HOPG, bem como nos terraços do eléctrodo. Considerando o intervalo de potencial utilizado nestas experiências de varrimentos sucessivos, os resultados sugerem que as nanoestruturas observadas por AFM são uma mistura de Pd(0) e de óxidos de paládio.

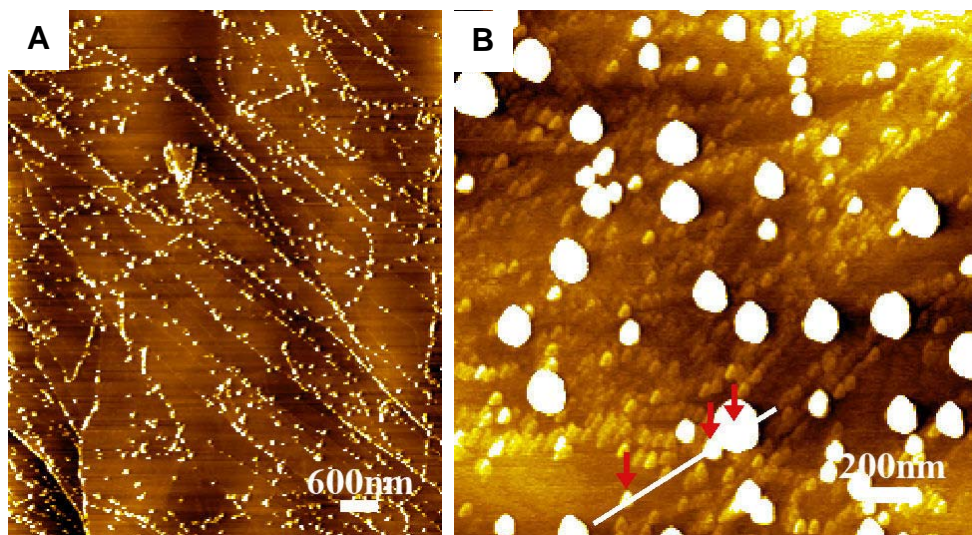


Figura 3.4 – Imagens de AFM [163] das nanoparticulas de paládio depositado numa solução de $0,1$ mM PdCl₂ em tampão fosfato $0,1$ M pH 7,0: **A**) após 5 varrimentos no intervalo de potencial $-0,50$ V – $0,00$ V, e **B**) após 15 varrimentos no intervalo de potencial $-0,50$ V ÷ $+0,90$ V.

Por isso, prosseguiu-se com a caracterização electroquímica por voltamétrie cíclica das nanoestruturas de paládio depositadas no eléctrodo. O GCE assim modificado foi imerso no electrólito de suporte. Esta experiência apresenta a vantagem de que todos os processos redox registados são provenientes das nanoestruturas de paládio electrodepositadas na superfície do GCE, sem a contribuição adicional das espécies de paládio presentes na solução. O GCE modificado com as nanoestruturas de paládio possibilitou o estudo das reacções redox apenas do paládio depositado, sem a contribuição das espécies presentes em solução.

3.2.2 Nanoestruturas de paládio electrodepositado nos eléctrodos de carbono

O paládio foi depositado na superfície do GCE a partir de uma solução de 100 μM PdCl_2 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 após a aplicação de um potencial condicionamento de -1,00 V por diferentes períodos de tempo: 5, 15 e 30 minutos, **Fig. 3.5**.

Os voltamogramas registados mostraram claramente a deposição de nanoestruturas de paládio na superfície do GCE. Foi observado que após períodos longos de deposição foram registadas correntes de picos mais elevadas, de acordo com uma maior quantidade de $\text{Pd}(0)$ depositado na superfície do GCE.

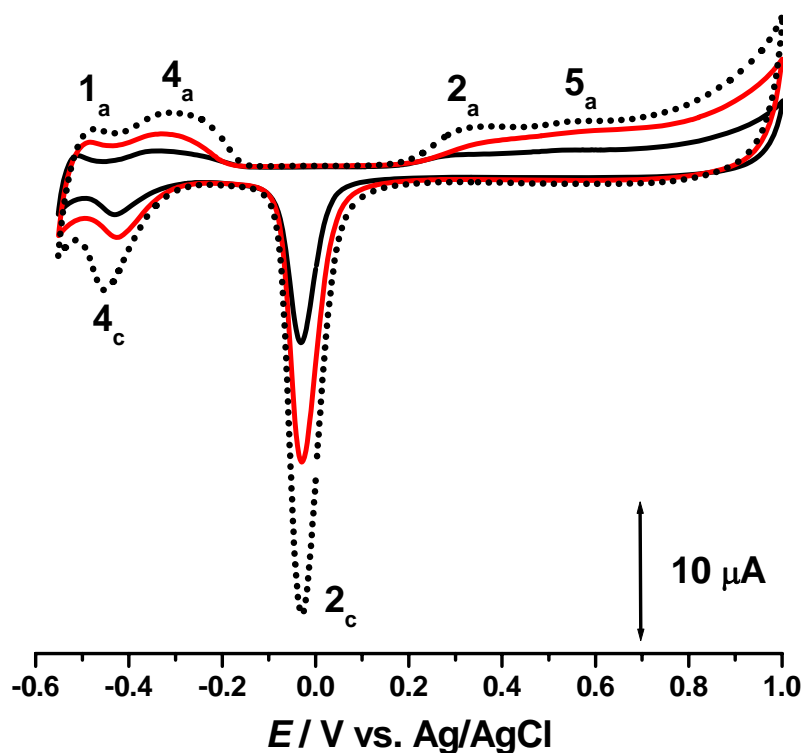


Figura 3.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato pH 7,0 após a aplicação do potencial de -1,00 V durante (—) 5, (—) 15 e (•••) 30 min. numa solução de 0,1 μM PdCl_2 .

Os varrimentos na solução tampão foram iniciados em 0,00 V no sentido positivo, num intervalo de potencial de -0,50 V a + 1,00 V. A corrente começou a aumentar para $E_{pa}^2 = +0,20$ V, dando origem ao pico 2_a , correspondente à formação de

óxidos de paládio; para potenciais mais positivos, também foi observado um pequeno pico 5_a , $E_{pa}^5 = +0,55$ V.

No varrimento inverso, ocorreu o pico de redução 2_c , $E_{pc}^2 = -0,02$ V, correspondente à redução dos óxidos de paládio formados no varrimento em sentido positivo. Um outro pico catódico 4_c , foi observado para $E_{pc}^4 = -0,45$ V, e após ter sido invertida a direção do varrimento em $-0,50$ V, também foram observados mais dois picos de oxidação, o pico 1_a em $E_{pa}^1 = -0,50$ V e o pico 4_a em $E_{pa}^4 = -0,30$ V.

Para clarificar os processos redox envolvidos na ocorrência dos picos 1_a e 4_a , foi realizada outra experiência após a electrodeposição de paládio na superfície do GCE aplicando o potencial de $+1,00$ V durante 30 minutos, para ocorrer a formação dos óxidos de paládio, **Fig. 3.6**. Os varrimentos foram registrados a partir de $0,00$ V, entre o limite de potencial positivo de $+1,00$ V e limites de potencial progressivamente mais negativos de: $-0,25$, $-0,55$, $-0,60$ e $-0,65$ V.

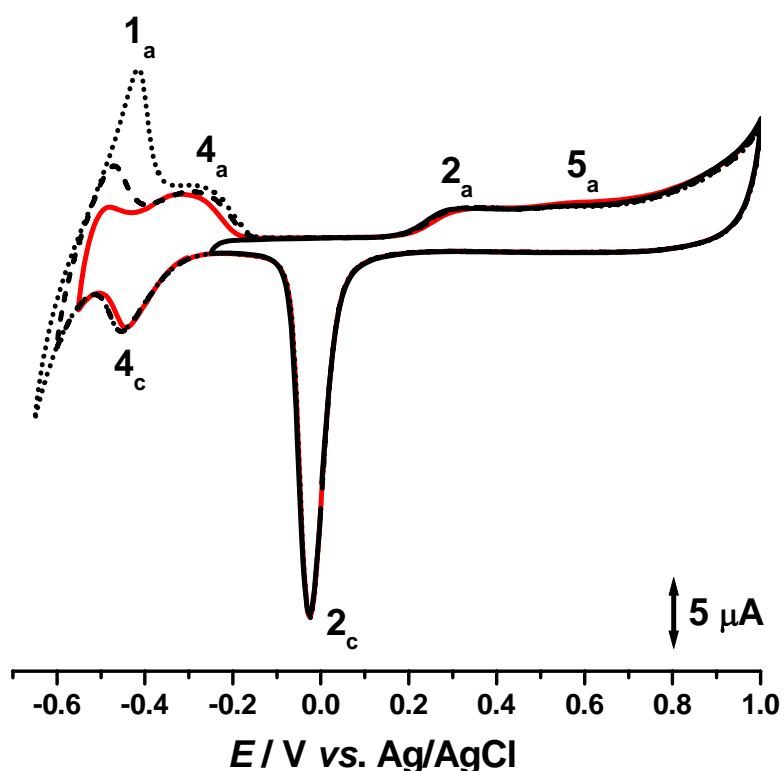


Figura 3.6 – Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos em tampão fosfato pH 7,0 após a aplicação do potencial de $+1,00$ V numa solução de $0,1$ mM PdCl_2 , registados entre o limite de potencial positivo de $+1,00$ V e o limite de potencial negativo de:

(—) - $0,25$ V, (---) - $0,55$ V, (· · ·) - $0,60$ V e (- · -) - $0,65$ V.

Os voltamogramas registados nestas condições mostraram a formação e a redução dos óxidos de paládio, o par redox 4_a-4_c e o pico 5_a . Quando a direcção do varrimento foi invertida em $-0,25$ V, antes da ocorrência dos picos 4_a e 4_c , nenhum dos picos de oxidação foi observado para potenciais negativos. No voltamograma seguinte, após a inversão do varrimento em $-0,55$ V, os picos 4_c-4_a apareceram, formando um par redox reversível.

Os voltamogramas seguintes, registados para limites negativos de $-0,60$ e de $-0,65$ V, mostraram a ocorrência do pico de oxidação 1_a , cuja corrente aumentou com o aumento do potencial negativo aplicado.

Este efeito sugere que o pico 1_a é devido à oxidação do hidrogénio adsorvido pelas nanoestruturas de paládio presentes na superfície do GCE durante os varrimentos no sentido negativo. No entanto, os varrimentos invertidos para limites de potencial progressivamente mais negativos não afectaram as correntes dos picos 4_a e 4_c , que permaneceram praticamente constantes.

Com base nos resultados obtidos por voltametria cíclica, imagens de AFM foram obtidas após a aplicação de um potencial negativo de $-1,00$ V, vs AgQRE, durante 30 minutos, para investigar a formação das nanoestruturas de Pd(0) no HOPG, **Fig. 3.7**, a partir de uma solução de $100 \mu\text{M PdCl}_2$.

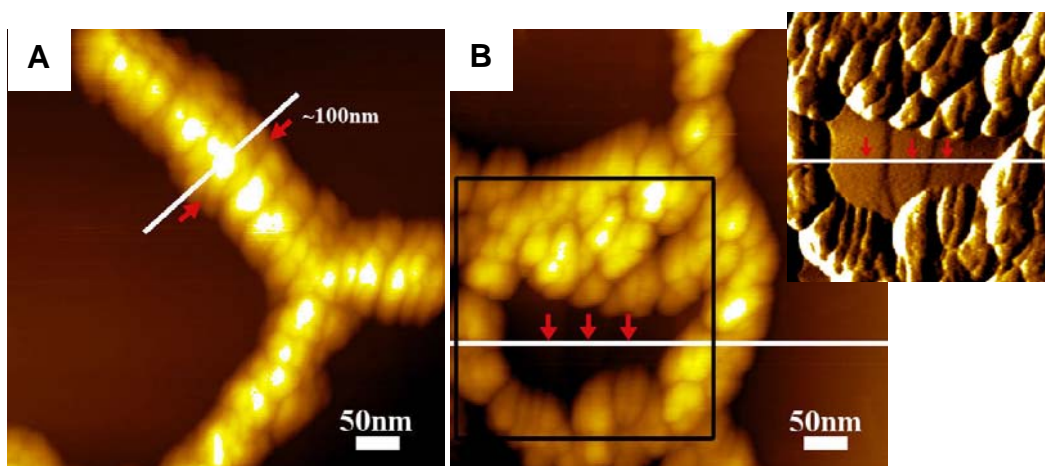


Figura 3.7 – Imagens de AFM [163] das nanoestruturas de paládio depositado pela aplicação do potencial de $-1,00$ V durante 30 min. numa solução de $0,1$ mM PdCl_2 :

A) nanofios de Pd(0) e **B)** filamentos circulares de Pd(0).

Este procedimento levou a formação de vários nanofios até 7 μm de comprimento, e com ramificações que seguem os defeitos ao longo da superfície do eléctrodo. As imagens de alta resolução mostram claramente a morfologia dos nanofios de Pd(0), **Fig. 3.7A**, sendo cada um formado por uma sequência de pequenas nanopartículas de 20 – 60 nm em diâmetro. Quando múltiplos defeitos estão presentes na superfície do eléctrodo, o Pd(0) está depositado como agregados e filamentos circulares, **Fig. 3.7B**. Sendo que a superfície de um eléctrodo de carbono vítreo apresenta uma maior rugosidade (rms 2,10 nm para o GCE e 0,06 nm para o HOPG [163]), ou seja, mais defeitos, os resultados de AFM levam a concluir que no GCE estes nanoestruturas, nanofios e também agregados, encontram-se com uma maior frequência.

Numa outra experiência, os voltamogramas foram registados na solução tampão entre o limite constante de potencial negativo de - 0,55 V, e limites de potencial progressivamente mais positivos: + 0,25, + 0,30, + 0,35, + 0,55, + 0,80 e + 1,00 V, **Fig. 3.8 e Fig. 3.9**, de maneira a estudar as diferenças nas etapas de formação de óxidos de paládio.

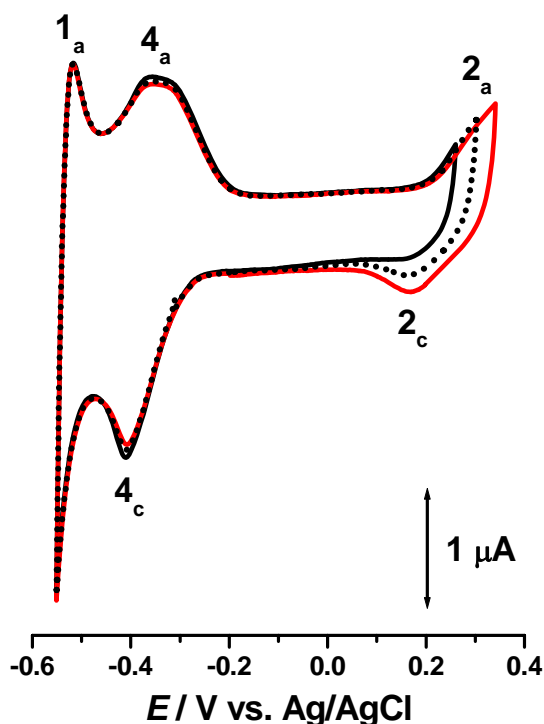


Figura 3.8 – Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos em tampão fosfato pH 7,0 após a aplicação do potencial de - 1,00 V numa solução de 0,1 mM PdCl₂, registados entre o limite de potencial negativo de - 0,55 V e o limite de potencial positivo de:

(—) + 0,25 V, (···) + 0,30 V e (—) + 0,35 V.

Quando o varrimento foi realizado até ao limite de potencial positivo inferior a + 0,40 V, o potencial de redução dos óxidos de paládio, pico 2_c, está ligeiramente deslocado para potenciais mais positivos, $E_{pc}^2 = + 0,16$ V, **Fig. 3.8**. Os resultados sugerem que no início da formação dos óxidos, os núcleos de paládio depositados na superfície do eléctrodo têm um comportamento redox reversível, pico 2_a, $E_{pa}^2 = + 0,20$ V.

No entanto, nos varrimentos registados para limites de potencial positivo mais elevados, **Fig. 3.9**, o potencial do pico 2_c tornou-se consideravelmente mais negativo $E_{pc}^2 = - 0,02$ V, mostrando o aumento na irreversibilidade do processo, bem como um aumento significativo nas correntes de pico.

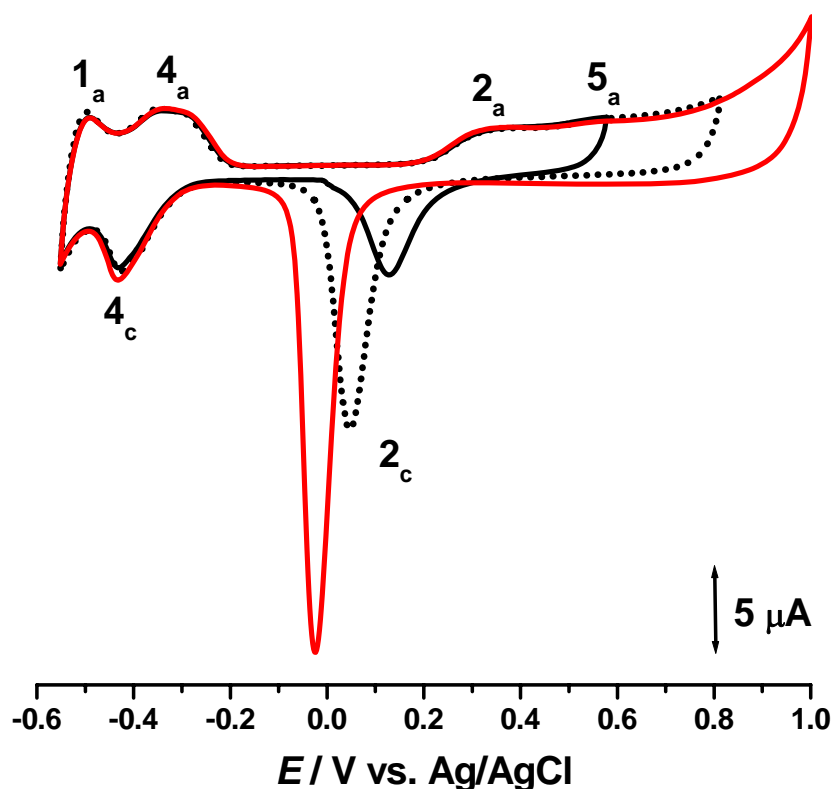


Figura 3.9 – Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos em tampão fosfato pH 7,0 após a aplicação do potencial de - 1,00 V numa solução de 0,1 mM PdCl₂, registados entre o limite de potencial negativo de - 0,55 V e o limite de potencial positivo de:

(—) + 0,55 V, (•••) + 0,80 V e (—) + 1,00 V.

Voltamogramas cíclicos foram também registrados em electrólitos de suporte com diferentes valores de pH, quer directamente em soluções de 100 μM PdCl_2 , **Fig. 3.10**, quer depois da electrodeposição do Pd na superfície do GCE, **Fig. 3.11**, mostrando claramente que todos os processos redox do paládio são dependentes do pH.

Dos resultados obtidos em solução, dois aspectos importantes devem ser concluídos. Primeiro, o voltamograma obtido em meio ácido mostrou um pico de oxidação no primeiro varrimento, $E_{\text{pa}} = + 0,60$ V em **Fig. 3.10**. Este pico também ocorre quando o varrimento é iniciado em 0,00 V no sentido positivo e corresponde à oxidação do Pd^{2+} da solução com a formação das espécies de Pd^{4+} . Em segundo lugar, nos voltamogramas obtidos em meio alcalino, um pequeno pico catódico ocorreu no primeiro varrimento, $E_{\text{pc}} = - 0,95$ V em **Fig. 3.10**, devido à redução do Pd^{2+} e electrodeposição de nanopartículas de $\text{Pd}(0)$ na superfície do GCE.

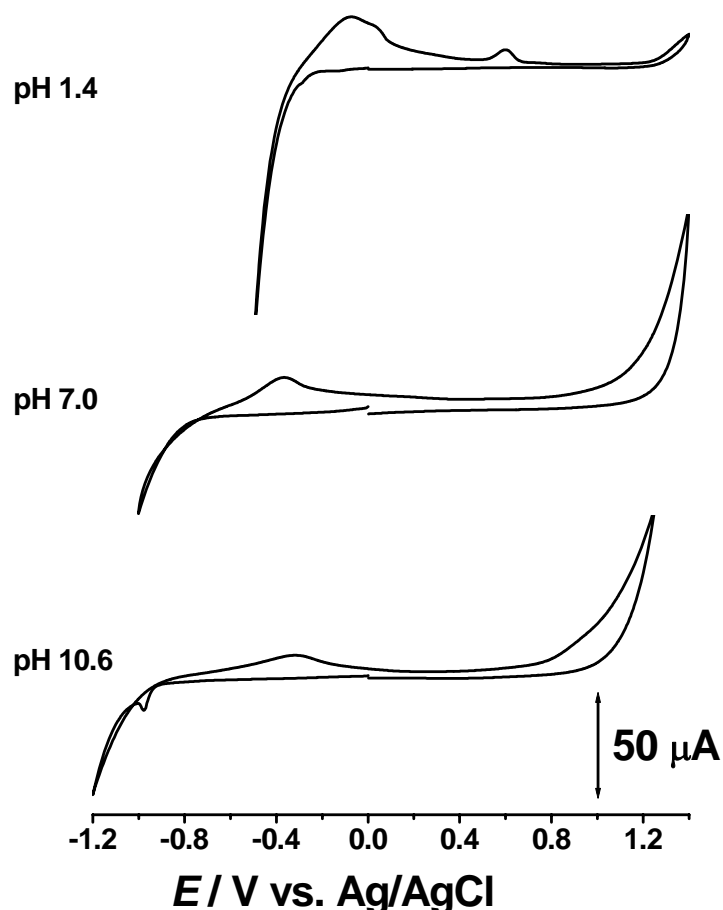


Figura 3.10 – Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0,1 mM PdCl_2 , saturadas com N_2 , à diferentes valores de pH.

Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes valores de pH após a electrodeposição das nanopartículas de Pd(0) na superfície do GCE, **Fig. 3.11**, mostram os processos redox do paládio de maneira muito mais clara. O comportamento electroquímico em meio ácido é semelhante aos resultados obtidos em meio neutro. No entanto, foram obtidas correntes de pico maiores em soluções ácidas, provavelmente devido a uma maior concentração de $H^+(aq)$.

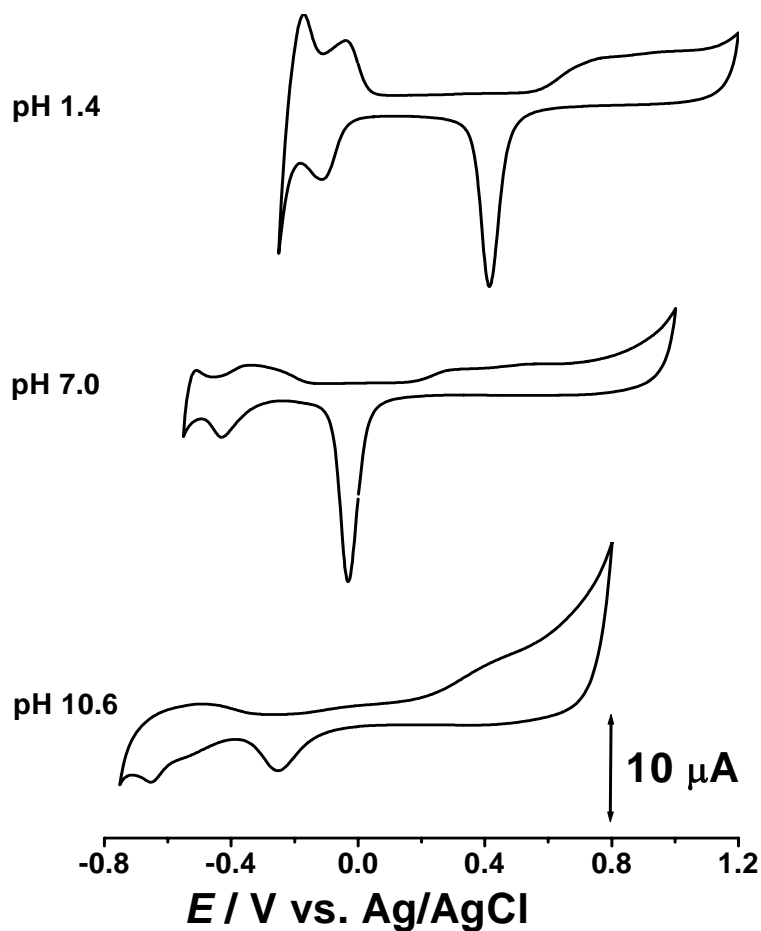


Figura 3.11 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes electrólitos de suporte, saturados com N_2 , após a aplicação do potencial de $-1,00$ V numa solução de $0,1$ mM $PdCl_2$.

Uma diferença notável foi observada em electrólito de suporte alcalino onde todas as correntes registadas são menores. A formação dos óxidos de paládio é bem definida, para um potencial de $\approx +0,40$ V, mas no varrimento em sentido negativo a redução dos mesmos ocorre com uma corrente de pico menor em relação aos resultados obtidos em meio ácido e neutro. Além disso, o pico 4_c ocorre a um potencial mais

negativo e sem evidência da oxidação reversível correspondente, como observado em meio ácido. Estes resultados podem ser explicados com base na formação de uma camada de óxido/hidróxido de paládio na superfície do eléctrodo, mais estável em meio alcalino devido a elevada concentração de OH^- na interface eléctrodo/solução.

Embora a presença dos iões de Cl^- ou de HSO_4^- nos electrólitos de suporte possa ter contribuído para as altas correntes de oxidação registadas em meio ácido e neutro, pela formação de complexos intermediários solúveis [182], é difícil de avaliar a natureza e o estado de oxidação destes complexos. A redução dos complexos formados deveria ter facilitado a dissolução do paládio da superfície do eléctrodo, o que não foi confirmado nos resultados em meio ácido e neutro. Ao contrário, os voltamogramas registados a pH 7,0, **Fig. 3.3**, mostraram que uma vez o paládio depositado no eléctrodo é muito difícil ser removido, e pode sofrer varrimentos contínuos sem uma diminuição notável nas correntes de pico.

Em conclusão, apesar de não se observar nenhuma reacção de transferência de carga nos primeiros varrimentos catódicos na **Fig. 3.1** e **Fig. 3.2**, a ocorrência do pico anódico 1_a pode ser explicada com base num processo de redução que ocorre anteriormente a este processo de oxidação, ou seja, a redução de Pd^{2+} a partir da solução para o $\text{Pd}(0)$, num mecanismo que envolve a transferência de dois electrões. Devido ao elevado potencial negativo, apenas no electrólito de suporte de pH 10,6, **Fig. 3.10**, foi observado um pequeno pico catódico no primeiro voltamograma registado, como prova da redução dos iões de Pd^{2+} . A redução e deposição do paládio nas superfícies de eléctrodos de carbono foi claramente mostrada por AFM pela formação de nanopartículas e nanofios na **Fig. 3.7A e B**.

A ocorrência do pico anódico 1_a , e dos picos $1'_a$ e $1''_a$ na **Fig. 3.2** foi associada a uma das mais importantes propriedades do paládio: a capacidade de adsorver o hidrogénio molecular, na sua superfície, e de o absorver, dentro da sua rede cristalina. Durante os varrimentos catódicos nanoestruturas de $\text{Pd}(0)$ são formadas na superfície do eléctrodo, e quando o potencial atinge valores suficientemente negativos, **Fig. 3.1** e **Fig. 3.6**, os prótons são reduzidos a hidrogénio, que então é adsorvido na superfície do paládio e absorvido na sua rede. Ao inverter o sentido do varrimento, o pico 1_a surge devido à oxidação dos átomos de hidrogénio. Com a aplicação de potenciais mais

negativos e aumentando o número de varrimentos na solução de Pd^{2+} , mais Pd metal é depositado na superfície do GCE que permite a incorporação de mais hidrogénio na sua rede, **Fig. 3.2**. A consequência é a possibilidade de uma boa separação do pico 1_a em dois picos, $1'_a$ e $1''_a$, correspondentes à oxidação do hidrogénio adsorvido, pico $1'_a$, e absorvido, pico $1''_a$, pelas nanoestruturas de paládio.

Este efeito não foi observado quando os varrimentos foram realizados apenas no intervalo de potencial negativo 0,00 V – -1,00 V, ou quando $E < + 1,20$ V, **Fig. 3.9**. Assim, pode concluir-se que a separação do pico 1_a está directamente relacionada com um distúrbio na rede cristalina do paládio quando são aplicados elevados potenciais positivos [184].

Nos varrimentos anódicos, quando o potencial atinge valores suficientemente positivos, as nanopartículas e os nanofios de Pd(0) depositados na superfície do GCE sofrem oxidação para Pd^{2+} ou Pd^{4+} e formam uma camada de óxidos de paládio. Adicionalmente, os voltamogramas registados em meio ácido indicam que um maior estado de oxidação do Pd, muito provavelmente Pd^{4+} , está também envolvido, **Fig. 3.10**, levando à formação de uma segunda camada de PdO_2 [192].

Após a inversão do sentido do varrimento para + 1,00 V ou + 1,20 V, os óxidos de paládio são reduzidos a Pd(0). Dependendo do limite de potencial positivo, a redução da camada de óxidos ocorre numa forma reversível ou irreversível. Para os varrimentos realizados até ao limite de potencial positivo $E > + 0,40$ V, a redução da camada de óxidos de paládio ocorre de maneira irreversível, num processo que pode ser explicado devido à formação da camada adicional de PdO_2 . As imagens de AFM confirmaram a presença de uma camada de óxidos, formada nos terraços planos do HOPG, **Fig 3.4**, que também pode oferecer locais de nucleação para o crescimento adicional de nanoestruturas de Pd(0). Este fenómeno explica a distribuição mais uniforme das nanopartículas na superfície do eléctrodo formadas durante varrimentos sucessivos até $E = + 0,90$ V, quando comparando com as nanopartículas e os nanofios de Pd(0) formados pela aplicação do potencial $E = - 1,00$ V, que são depositados preferencialmente nos defeitos do eléctrodo, **Fig. 3.7**.

As experiências realizadas com as nanopartículas de Pd(0) depositadas na superfície do GCE em electrólito de suporte, ou seja, sem a difusão de espécies a partir

da solução, indicaram claramente que a formação da camada de óxidos de paládio começa a potenciais negativos, os picos 4_a-4_c na **Fig. 3.6** e **Fig. 3.9**. Este fenómeno está relacionado com a existência de adátomos de paládio metal fortemente reactivos, que podem levar à formação reversível de adátomo/óxido incipiente na região de adsorção do hidrogénio no paládio. O fenómeno foi postulado anteriormente [189], mas só trabalhos experimentais recentes evidenciaram a formação de uma monocamada de pré-óxido na superfície do metal de paládio e também de outros metais nobres [184].

A formação de pré-óxidos nas superfícies metálicas pode ser explicada com base nas propriedades em nanoescala das partículas metálicas [189]. Uma característica importante é que, uma vez que estas partículas são extremamente pequenas, o potencial redox é dependente do seu tamanho.

Este fenómeno foi explicado tendo em conta que um átomo de metal isolado é uma espécie altamente electropositiva, um efeito atribuído à diminuição da energia de estabilização da rede ou à presença de efeitos quânticos de confinamento [189, 192]. Desta maneira, é sugerido que os átomos de metal de paládio dispersos na superfície do eléctrodo são responsáveis pelos efeitos de pré-oxidação.

Assim, a formação da camada de óxidos é iniciada com a formação duma monocamada de pré-óxidos na superfície do eléctrodo numa rápida descarga de H_2O ou OH^- para produzir espécies de PdOH. Ao nível de monocamada, os filmes de óxido nas superfícies de metais nobres podem ser irreversivelmente transformados em estruturas mais estáveis, quer através de um processo de dismutação chamado mecanismo de câmbio do local [185] ou através de um processo electroquímico que envolve a transferência de electrões e protões com a participação de OH^- [188].

Independentemente do mecanismo, o resultado destes processos é a formação de uma camada estável de óxidos na superfície do eléctrodo, **Fig. 3.6**, representada pelo aumento da corrente perto do potencial de + 0,20 V. Nas imagens de AFM realizadas após varrimentos no intervalo de potencial de -0,50 – 0,00 V, foi confirmada a presença de depósitos muito pequenos de paládio no plano basal do HOPG, **Fig. 3.4**, provavelmente relacionados com a formação dos pré-óxidos de paládio para potenciais negativos.

3.3 Sulfato de paládio

3.3.1 A voltametria do paládio em solução

As reações redox do paládio no GCE foram investigadas por voltametria cíclica, numa solução de 0,1 mM PdSO₄, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 saturada com N₂. O varrimento foi iniciado em $E_i = 0,00$ V, em sentido positivo no intervalo de potencial de $E_1 = +1,00$ V a $E_2 = -1,00$ V.

Apesar de não observar uma transferência de carga no primeiro varrimento, **Fig. 3.12**, um pequeno pico 1_a ocorreu a $E_{pa}^1 = -0,35$ V após ter sido invertido o sentido do varrimento em $E_2 = -1,00$ V. Varrimentos sucessivos registados na mesma solução levaram a um aumento considerável da corrente do pico 1_a.

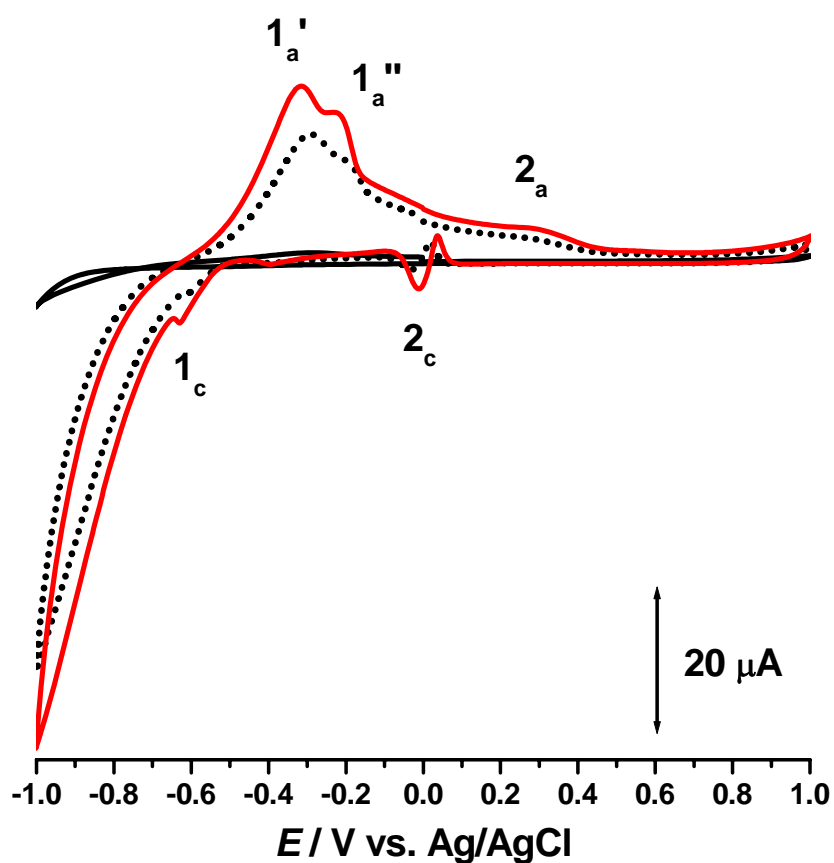


Figura 3.12 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 0,1 mM PdSO₄ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1º, (•••) 5º e (—) 10º varrimento.

Depois de vários voltamogramas consecutivos foi observado que o pico 1_a , corresponde agora aos picos de oxidação $1_a'$, $E_{pa}^{1'} = -0,31$ V, e $1_a''$, $E_{pa}^{1''} = -0,22$ V. Foram também observados o pico de oxidação 2_a , no $E_{pa}^2 = +0,30$ V, e dois picos de redução 2_c , $E_{pc}^2 = +0,02$ V, e 3_c , $E_{pc}^3 = -0,63$ V. Estes picos ocorreram somente após uma extensa ciclagem, e um aumento significativo da corrente base negativa foi observado com o aumento do número de varrimentos. A mesma experiência foi repetida em soluções mais concentradas de 0,62 mM e de 1,0 mM PdSO₄, **Fig. 3.13** e **Fig. 3.14**, e um novo par redox, os picos $4_c - 4_a$, foi observado nestas condições.

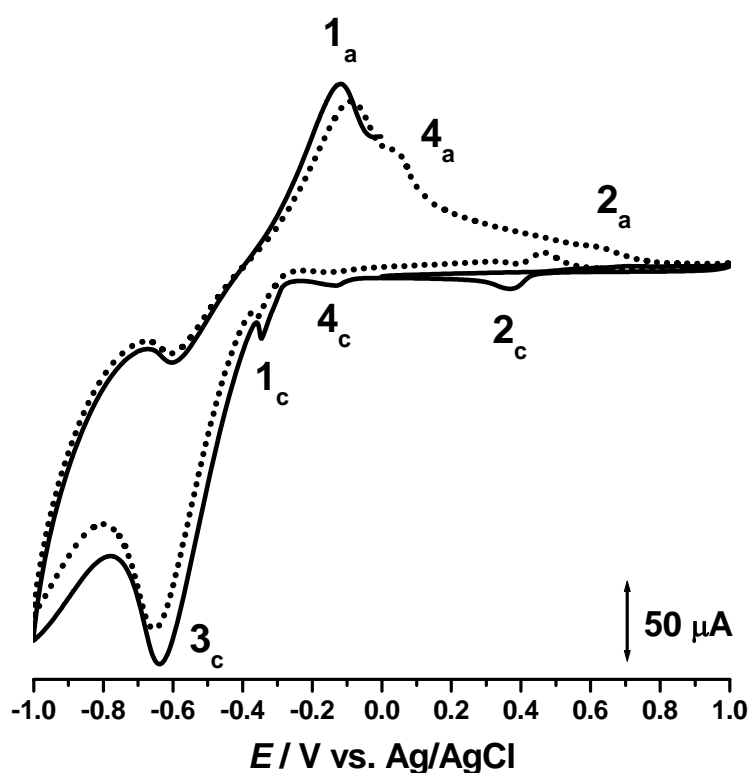


Figura 3.13 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 1 mM PdSO₄ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1^o, e (•••) 5^o varrimento.

Na **Fig. 3.15** são apresentados os voltamogramas registados em 0,62 mM PdSO₄, começando o varrimento em $E_i = 0,00$ V entre o limite de potencial positivo $E_1 = +1,00$ V, e aplicando progressivamente limites de potencial mais negativo, $E_2 = -0,30$ V, $-0,45$ V ou $-0,65$ V.

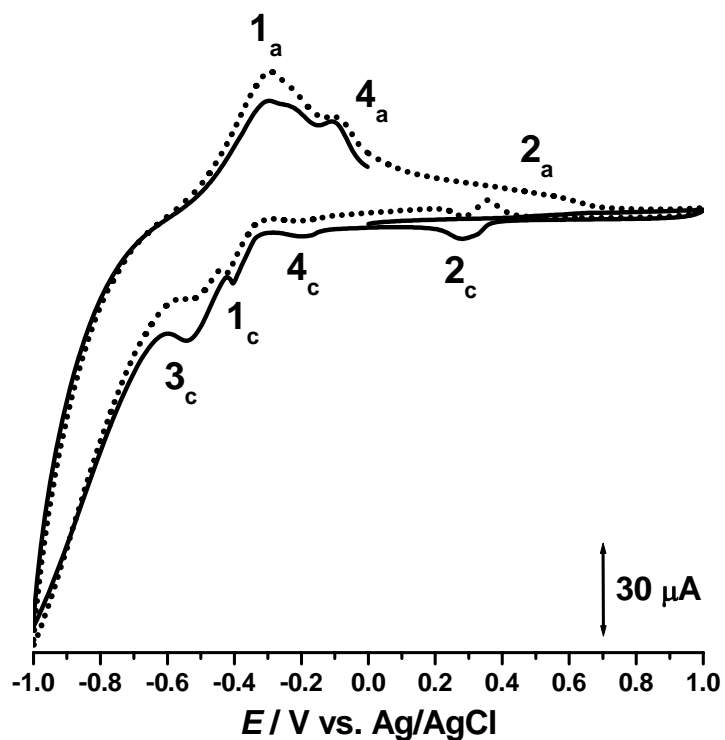


Figura 3.14 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 0,62 mM PdSO₄ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1^o, e (•••) 5^o varrimento.

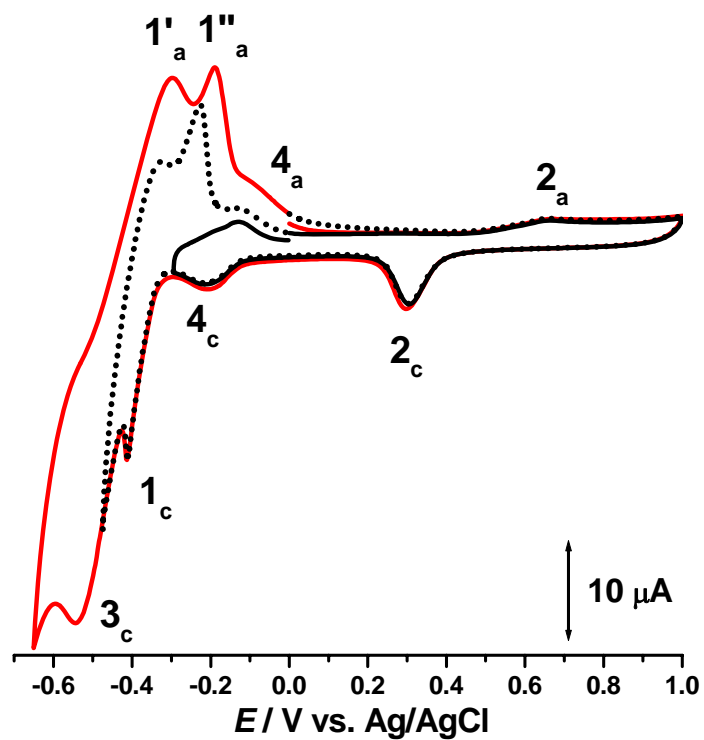


Figura 3.15 – Voltamogramas cíclicos sucesivos numa solução de 0,62 mM PdSO₄ registados até o limite de potencial negativo de: (—) - 0,65 V, (•••) - 0,45 V e (—) - 0,30 V

No primeiro varrimento registado, com o limite de potencial negativo de - 0,30 V, o voltamograma mostra claramente a reversibilidade do par redox $4_c - 4_a$, $E_{pc}^4 = - 0,21$ V e $E_{pa}^4 = - 0,13$ V. Com o aumento do limite de potencial negativo para - 0,45 V e - 0,65 V foram observados os picos catódicos 1_c e 3_c , e após a inversão do sentido de varrimento, os picos anódicos $1_a'$ e $1_a''$.

Foram também realizados voltamogramas numa solução de 1,0 mM PdSO₄, a partir de $E_i = 0,00$ V e aumentando sucessivamente o limite de potencial positivo para $E_i = + 0,70$ V, + 1,00 V ou + 1,40 V, **Fig. 3.16A**. Quando o varrimento foi invertido em + 0,70 V, logo após o pico 2_a , $E_{pa}^2 = + 0,64$ V, o voltamograma mostrou o pico catódico P_c em $E_{pc}^P = + 0,53$ V. No seguinte voltamograma foi registado um novo pico de oxidação 5_a , $E_{pa}^5 = + 0,72$ V, e quando o varrimento foi invertido em + 1,00 V o pico P_c foi deslocado para um potencial mais negativo, $E_{pc}^P = + 0,45$ V.

No voltamograma a seguir, até ao limite de + 1,40 V, foi observado um pequeno pico para potenciais positivos elevados, $E_{pa}^6 = + 1,30$ V, enquanto o pico P_c ocorreu para $E_{pc}^P = + 0,32$ V. As técnicas voltamétricas de onda quadrada e de impulso diferencial também foram utilizadas, realizando varrimentos no intervalo de potencial 0,00 V – + 1,40 V de maneira a elucidar os processos implicados na ocorrência destes picos de oxidação, **Fig. 3.16B e C**.

Na imagem de AFM, **Fig. 3.17**, obtida após dez varrimentos de voltametria cíclica numa solução de 0,1 mM PdSO₄ no intervalo de potencial - 1,00 V – + 1,00 V, foi observada a formação de duas estruturas diferentes: nanopartículas de paládio com forma irregular, de $\approx 12 - 26$ nm de altura, posicionadas aleatoriamente no plano basal do eléctrodo, indicado na figura pela seta preta, e fragmentos muito pequenos de 1 – 5 nm de altura, uniformemente distribuídos no eléctrodo entre as nanopartículas de paládio, assinalados por setas vermelhas na mesma figura.

As experiências de electroquímica na solução de PdSO₄ mostraram um comportamento redox complexo. Todos os picos estão relacionados com os diferentes estados de oxidação do paládio que sofre várias reações redox, como a deposição de nanoestruturas de Pd(0), a oxidação destas e a formação de óxidos de paládio. Também foi observado que o potencial ao qual esses processos ocorrem é dependente da concentração.

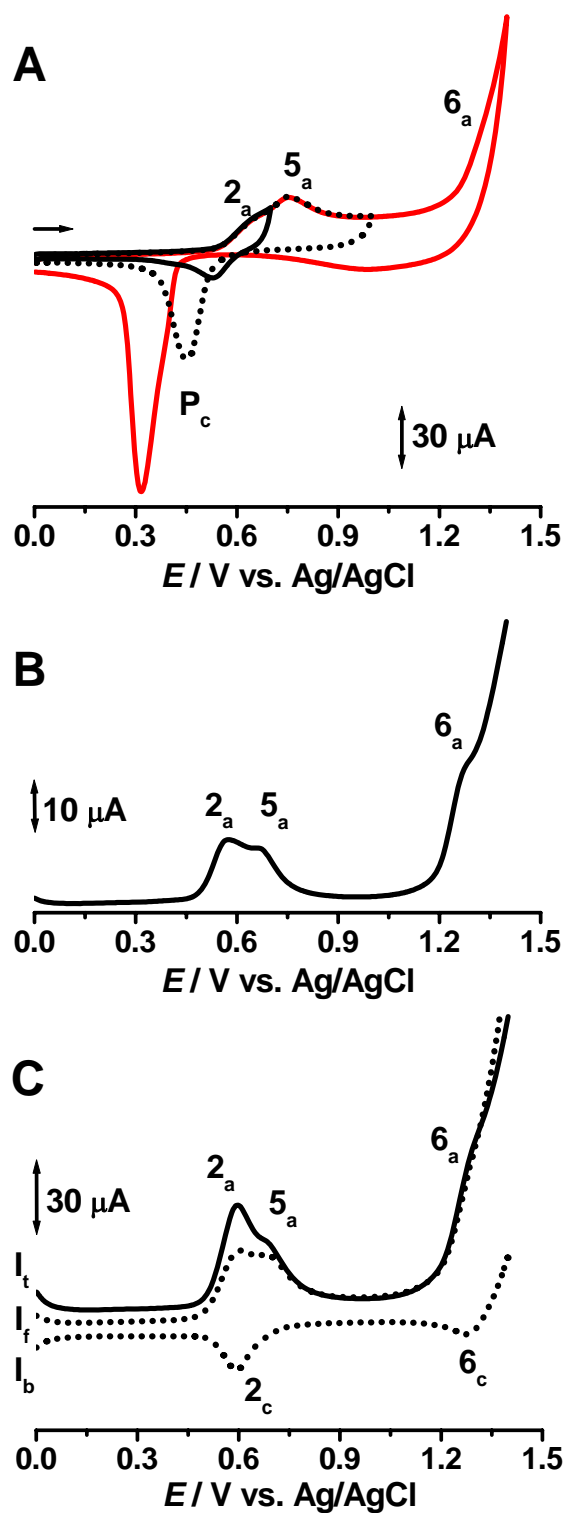


Figura 3.16 – Voltamogramas numa solução de 1,0 mM PdSO₄:

- A) três varrimentos sucessivos até o limite de potencial positivo de (—) + 0,70 V, (•••) + 1,00 V e (—) + 1,40 V, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, B) voltamograma de impulso diferencial, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e C) voltamograma de onda quadrada, $v = 15 \text{ mV s}^{-1}$

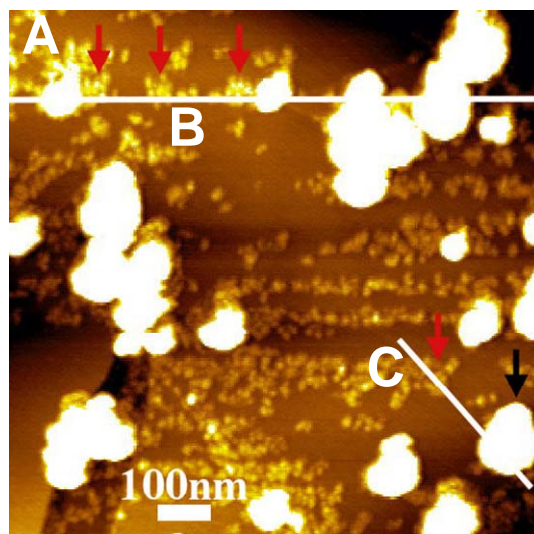


Figura 3.17 – Imagem de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após 10 varrimentos de voltametria cíclica numa solução de 0,1 mM PdSO₄.

Considerando os processos redox observados em solução, **Fig. 3.13**, durante o varrimento no sentido negativo até ao potencial $E_2 = -1,00$ V, os protões foram reduzidos a hidrogénio, o pico 1_c . Quando o potencial chega a valores suficientemente mais negativas os iões de Pd²⁺ são reduzidos a Pd(0) [163], o pico 3_c em $E_{pc}^3 = -0,63$ V, correspondente à formação de nanoestruturas de paládio. É bem conhecido que o H₂ é adsorvido com facilidade na superfície do Pd(0) e absorvido na sua rede cristalina [163, 178, 179, 192]. Ao inverter o sentido do varrimento em -1,00 V, ocorreram dois picos anódicos $1_a'$ e $1_a''$, devido à oxidação dos átomos de hidrogénio adsorvido, pico $1_a'$, e absorvido, o pico $1_a''$ [177-179], nas nanoestruturas de Pd(0) electrodepositado na superfície do eléctrodo durante o varrimento em sentido negativo.

Registando varrimentos sucessivos numa solução de concentração baixa de 0,1 mM PdSO₄, **Fig. 3.12**, ou utilizando soluções de concentração mais elevada, 0,62 mM ou 1,0 mM PdSO₄, **Fig. 3.13** – **Fig. 3.15**, mais Pd(0) é electrodepositado na superfície do GCE, permitindo assim a incorporação de mais hidrogénio. O efeito da incorporação de hidrogénio, na superfície e na rede das nanoestruturas de paládio, foi estudado registando varrimentos entre um limite de potencial positivo fixo e limites de potencial sucessivamente mais negativo, **Fig. 3.15**. Nestas condições, foi observado

que a corrente do pico 1_a aumentou, e o potencial do pico foi deslocado para valores mais positivos após a aplicação de limites de potencial mais negativo, devido à reorganização estrutural das nanoestruturas de Pd(0). Quando o sentido do varrimento foi invertido em - 0,45 V, ou seja, logo após a redução dos protões, as correntes de oxidação dos picos $1_a'$ e $1_a''$ diminuíram, **Fig. 3.15**. Como esperado, estes picos desapareceram completamente quando o varrimento foi invertido em - 0,30 V, pouco antes de ocorrer a redução dos protões, o que confirma que os picos $1_a'$ e $1_a''$ estão relacionados com a oxidação dos átomos de hidrogénio, adsorvido e absorvido na rede das nanoestruturas de Pd(0) electrodepositado na superfície do eléctrodo.

Para potenciais positivos, o Pd(0) depositado na superfície do eléctrodo sofre oxidação, formando uma camada de óxidos de paládio [163, 192], que corresponde à ocorrência dos picos de oxidação 2_a , 5_a e 6_a , **Fig. 3.15** e **Fig. 3.16**. Estes óxidos de paládio são reduzidos nos varrimentos em sentido negativo, correspondente ao pico P_c . As diferentes etapas de formação da camada de óxidos de paládio são mostradas nos voltamogramas registrados com início em $E_i = 0,00$ V e sucessivamente aumentando o limite de potencial positivo, **Fig. 3.16A**. Foi observado que o pico 2_a foi seguido pelos picos de oxidação 5_a e 6_a , e que aumentando o limite de potencial positivo o pico de redução P_c foi deslocado para potenciais menos positivos. O aumento da corrente de pico e a irreversibilidade do processo de redução dos óxidos de paládio sugere que o pico P_c já não corresponde apenas a redução das espécies oxidadas no pico de 2_a , mas a todas as espécies de óxidos de paládio formadas até $E_1 = + 1,4$ V no varrimento em sentido positivo. A presença do pico 6_a , apenas ligeiramente visível por voltamétrie cíclica, foi confirmada nos varrimentos de impulso diferencial, **Fig. 3.16B**, e a sua reversibilidade foi estabelecida pela voltamétrie de onda quadrada, **Fig. 3.16C**. O voltamograma de onda quadrada também confirmou a reversibilidade do par redox $2_a - 2_c$ e a irreversibilidade do pico 5_a , sem as interferências de outras espécies de óxidos de Pd.

3.3.2 Adsorção espontânea do paládio nos eléctrodos de carbono

Numa outra experiência, foi testada a possibilidade duma adsorção espontânea do paládio nos eléctrodos de carbono, a partir duma solução concentrada de 1,0 mM

PdSO_4 , em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Os eléctrodos de carbono, tanto o GCE como também o HOPG, foram imersos na solução acima mencionada durante 30 minutos. O procedimento conduziu a adsorção espontânea de paládio nas superfícies dos eléctrodos, que foram investigados por voltametria cíclica e por AFM [159].

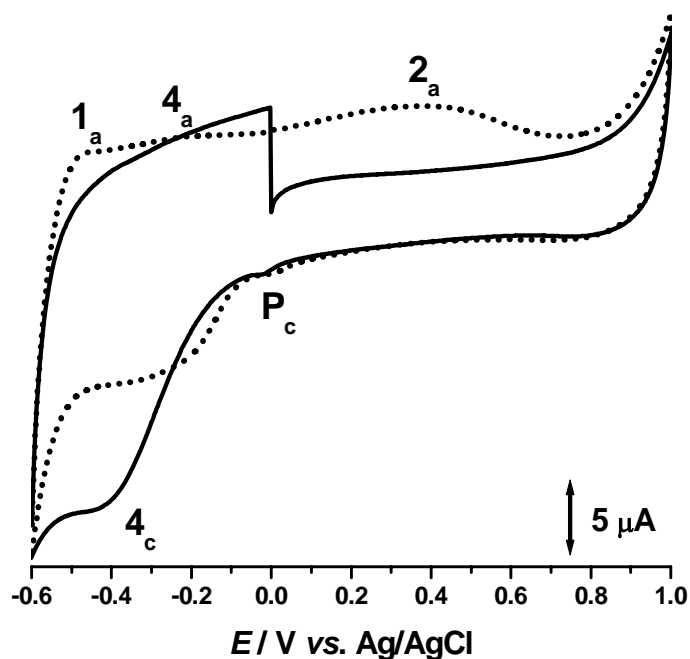


Figura 3.18 – Voltamogramas cíclicos em electrólito de suporte pH 7,0, após 30 min. de adsorção espontânea numa solução de 1,0 mM PdSO_4 : (—) 1º e (•••) 2º varrimento.

Os varrimentos registrados em electrólito de suporte a pH 7,0 mostraram picos menos definidos, **Fig. 3.18**, mas um comportamento electroquímico semelhante aos resultados obtidos em solução de PdSO_4 , confirmando assim a adsorção espontânea no GCE.

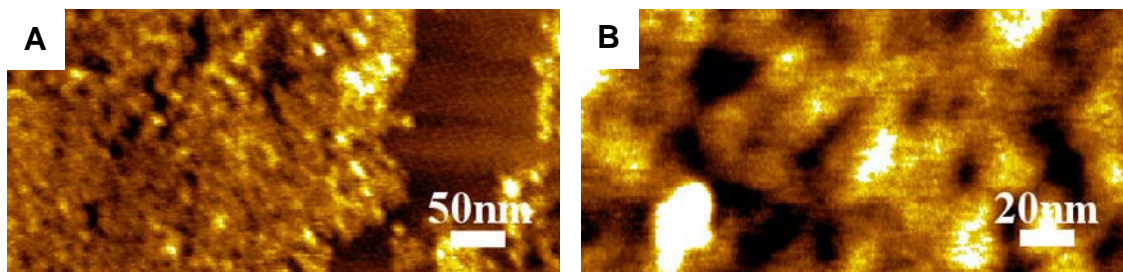


Figura 3.19 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após 30 min. de adsorção espontânea numa solução de 1,0 mM PdSO_4 .

As imagens de AFM mostraram a presença do paládio adsorvido espontaneamente no HOPG pela formação de uma rede incompleta na superfície do eléctrodo, **Fig. 3.19**, com 0,5 – 1,5 nm de espessura.

3.3.3 Nanoestruturas de paládio electrodepositado nos eléctrodos de carbono

O estudo das nanoestruturas de paládio electrodepositado a diferentes potenciais a partir de soluções de 0,1 mM ou 1,0 mM PdSO₄ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, foi efectuado na superfície de dois eléctrodos de carbono, GCE e HOPG, utilizando métodos voltamétricos e AFM [159]. A electrodeposição no GCE e no HOPG, durante 30 minutos, foi realizada aplicando os seguintes potenciais: - 1,00 V, em regime de OPD -“overpotential deposition”, para a deposição de paládio, - 0,45 V, em regime de UPD -“underpotential deposition”, para evitar a evolução do hidrogénio, - 0,20 V após a formação de pré-óxidos, + 0,15 V antes da formação de óxidos e + 1,00 V após a formação de óxidos. Os voltamogramas foram obtidos em tampão fosfato, registando os varrimentos a partir de $E_i = 0,00$ V no intervalo de potencial + 1,00 V – - 0,55 V.

A *electrodeposição de paládio em $E_{dep} = - 1,00$ V*. Os voltamogramas obtidos em electrólito de suporte mostraram, para as duas concentrações estudadas, os picos de oxidação 2_a, 5_a e o pico de redução P_c, e a potenciais mais negativos foram detectados o par redox 4_c - 4_a e o pico 1_a, **Fig. 3.20**. Foi observado que para as nanoestruturas depositadas a partir da solução mais concentrada, de 1,0 mM PdSO₄, as correntes de pico foram menores em relação às correntes registadas para as nanoestruturas obtidas a partir da solução de 0,1 mM PdSO₄.

As imagens de AFM mostraram diferenças significativas entre as nanoestruturas obtidas a partir das concentrações utilizadas. A electrodeposição efectuada em 0,1 mM PdSO₄ levou à formação de nanopartículas pequenas e de nanofios curtos até 6 µm de comprimento, **Fig. 3.21A**, cada nanofio de Pd(0) sendo composto por uma sequência de pequenas nanopartículas de 10 a 40 nm de diâmetro. A partir da solução de 1,0 mM PdSO₄, as imagens de AFM mostraram nanopartículas de Pd(0) muito bem distribuídas no eléctrodo, **Fig 3.21B**, de 17 nm de altura, com a tendência para estarem organizadas em pequenos aglomerados, e vários nanofios curtos e descontínuos nos defeitos do eléctrodo.

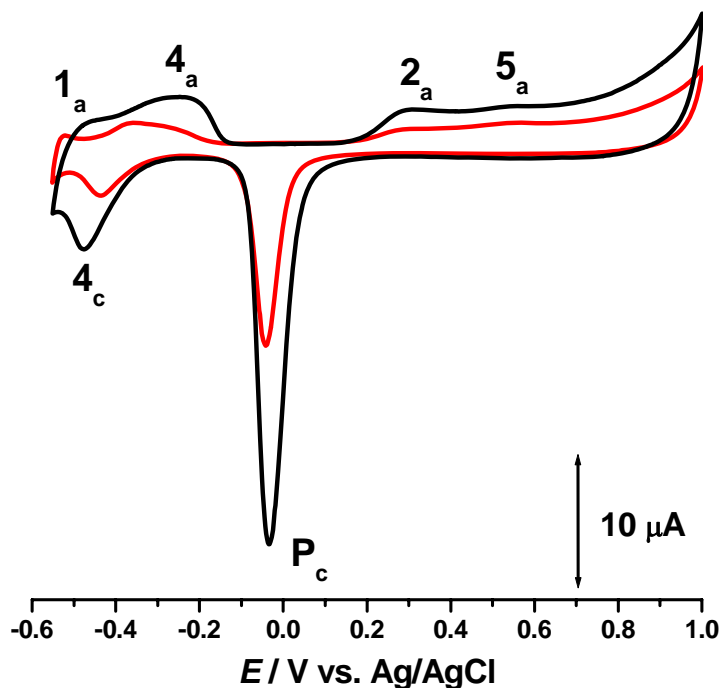


Figura 3.20 – Voltamogramas cíclicos obtidos em electrólito de suporte pH 7,0 após a aplicação do potencial de $-1,00$ V durante 30 min numa solução de:
 (—) 0,1 mM e de (—) 1,0 mM PdSO₄.

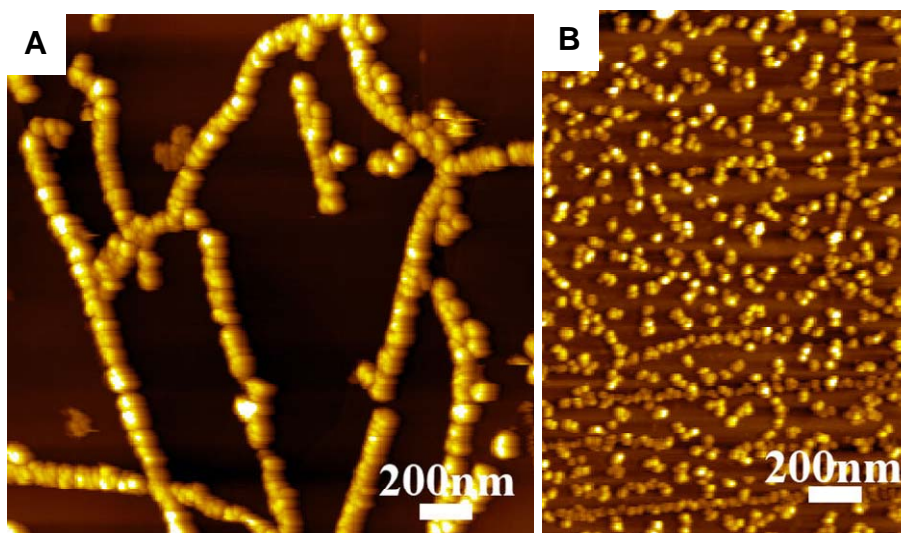


Figura 3.21 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após a aplicação do potencial de $-1,00$ V durante 30 min numa solução de:
 A) 0,1 mM e B) 1,0 mM PdSO₄.

A co-evolução do hidrogénio em $-1,00$ V provoca a formação e acumulação de um grande número de bolhas de H_2 perto do eléctrodo durante o processo de deposição, efeito observado tanto para o GCE, bem como para o HOPG. A formação destas bolhas, cobrindo grande parte da superfície do eléctrodo, impedem o crescimento contínuo e regular das nanoestruturas de Pd(0).

As diferenças de correntes observadas nos voltamogramas obtidos para as duas concentrações utilizadas e as variações de potencial para o par redox $4_c - 4_a$, **Fig. 3.20**, podem estar relacionadas com a presença de diferentes estruturas na superfície do eléctrodo, nanopartículas ou nanofios de Pd(0), **Fig. 3.21**, e/ou com a influência da co-evolução do H_2 nestas condições experimentais. Por isso, foi escolhido um outro potencial de electrodeposição de $-0,45$ V, de maneira a evitar a evolução do hidrogénio.

A *electrodeposição de paládio em $E_{dep} = -0,45$ V*. Os varrimentos registados em tampão após a electrodeposição em $0,1$ mM PdSO₄, **Fig. 3.22**, mostraram o pico de oxidação 5_a , o pico de redução P_c e o par redox $4_c - 4_a$, enquanto que após a electrodeposição de $1,0$ mM PdSO₄ foram detectados também os picos de oxidação 1_a e 2_a .

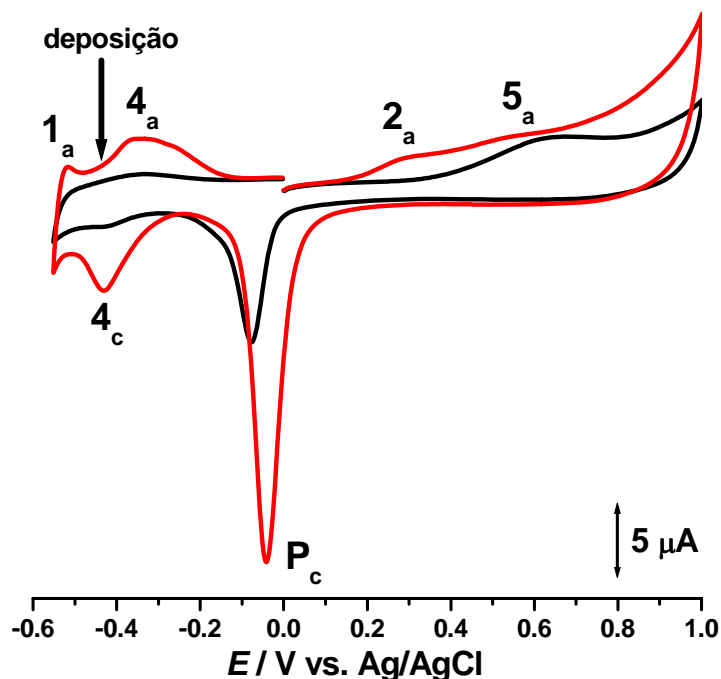


Figura 3.22 – Voltamogramas cíclicos obtidos em electrólito de suporte pH 7,0 após a aplicação do potencial de $-0,45$ V durante 30 min. numa solução de:

(—) $0,1$ mM e de (—) $1,0$ mM PdSO₄.

Na solução de 0,1 mM PdSO₄ foram obtidos nanofios contínuos até 7 μm de comprimento e perfeitamente regulares, **Fig. 3.23A e B**, e foram observados também nanopartículas, aglomerados e fragmentos muito pequenos na superfície do eléctrodo. A partir da solução de 1,0 mM PdSO₄, as imagens de AFM mostraram o aumento da cobertura do eléctrodo pelas nanoestruturas de paládio, **Fig. 3.23C e D**, mas com nanofios menores e menos uniformes.

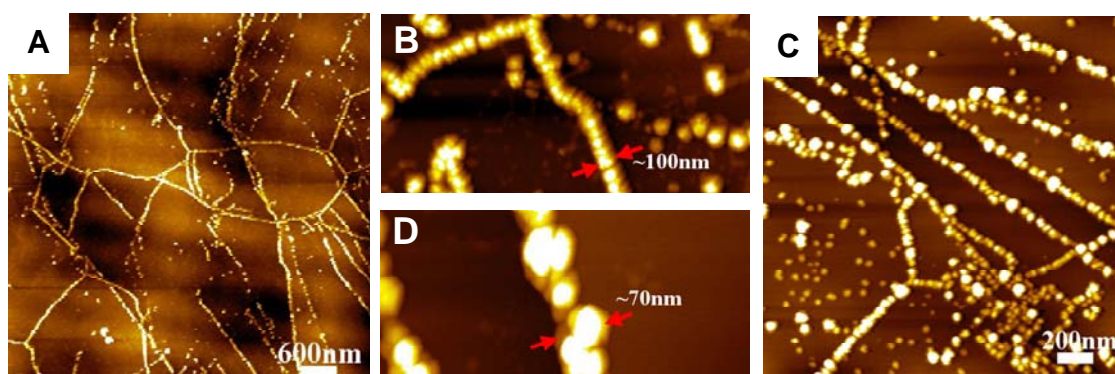


Figura 3.23 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após a aplicação do potencial de $-0,45$ V durante 30 min. numa solução de:

A, B) 0,1 mM e C, D) 1,0 mM PdSO₄.

O regime de UPD corresponde à deposição do Pd(0) metal a um potencial mais positivo do que o previsto pela equação de Nernst para a deposição. A aplicação do potencial de $-0,45$ V, em regime de UPD para evitar a co-evolução do H₂, leva à formação de nanofios de Pd(0) mais compridos e mais espessos, **Fig. 3.23**, do que os nanofios formados por OPD, mas para ambos os regimes os nanofios depositados a partir da concentração menor, 0,1 mM PdSO₄, apresentaram alturas maiores e morfologias mais regulares e homogéneas. Pelo contrário, a electrodeposição na solução de concentração maior, aumenta o número de pontos de nucleação na superfície e conseqüentemente aumenta também a distribuição das nanopartículas no eléctrodo.

A *electrodeposição de paládio em $E_{dep} = -0,20$ V*. Sendo que o par redox $4_c - 4_a$ associado com a formação dos pré-óxidos de paládio ocorre em $\approx -0,25$ V, **Fig. 3.20**, na presença de nanopartículas de Pd(0) na superfície do eléctrodo, **Fig. 3.21B**, e em $\approx -0,40$ V, para os nanofios de Pd(0), **Fig. 3.21A**, foi escolhido um potencial de

deposição mais positivo, - 0,20 V, após a formação dos pré-óxidos, para investigar as nanoestruturas depositadas nestas condições.

Os voltamogramas registados após a electrodeposição em 0,1 mM PdSO₄ mostraram correntes de pico pequenas, **Fig. 3.24 Inserto**. As imagens de AFM obtidas, **Fig. 3.25A**, mostraram nanopartículas globulares, de 20 nm de altura, depositadas nos defeitos do eléctrodo, e aglomerados muito pequenos nos terraços planos do HOPG. Após a electrodeposição a partir da solução de 1,0 mM PdSO₄, **Fig. 3.24**, nos voltamogramas registados foram observados todos os picos característicos para o intervalo de potencial escolhido, muito bem definidos. As imagens de AFM, **Fig. 3.25B**, mostraram um filme muito espesso de ≈100 nm de altura, com aspecto granuloso, que encobre todo o eléctrodo. A interpretação dos picos voltamétricos 4_c - 4_a não é consensual, e tem sido relacionada na literatura tanto com um processo de pré-oxidação monocamada [187] ou com o hidrogénio adsorvido [178].

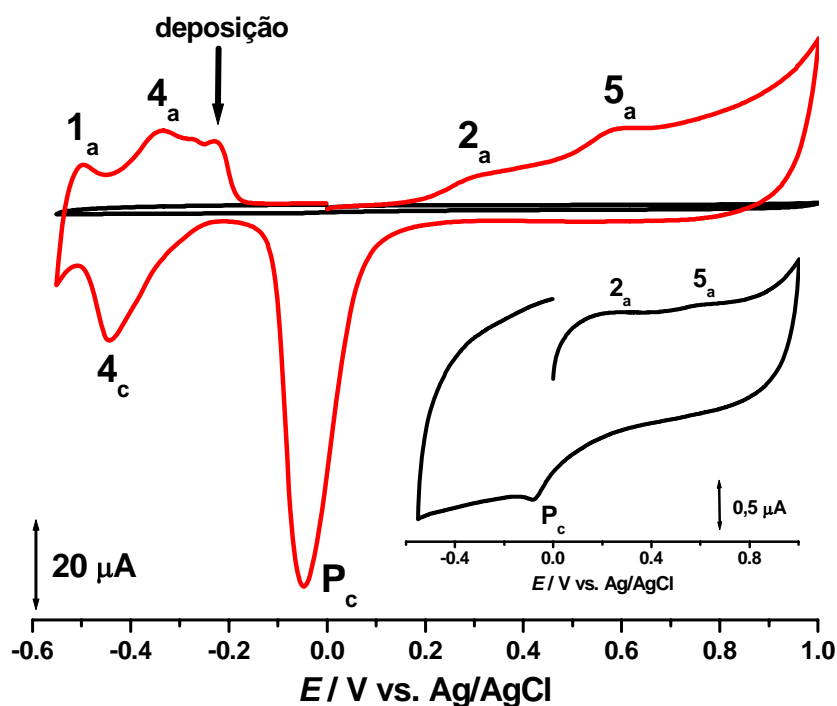


Figura 3.24 – Voltamogramas cíclicos obtidos em electrólito de suporte pH 7,0 após a aplicação do potencial de - 0,20 V durante 30 min. numa solução de:

(—) 0,1 mM e de (—) 1,0 mM PdSO₄.

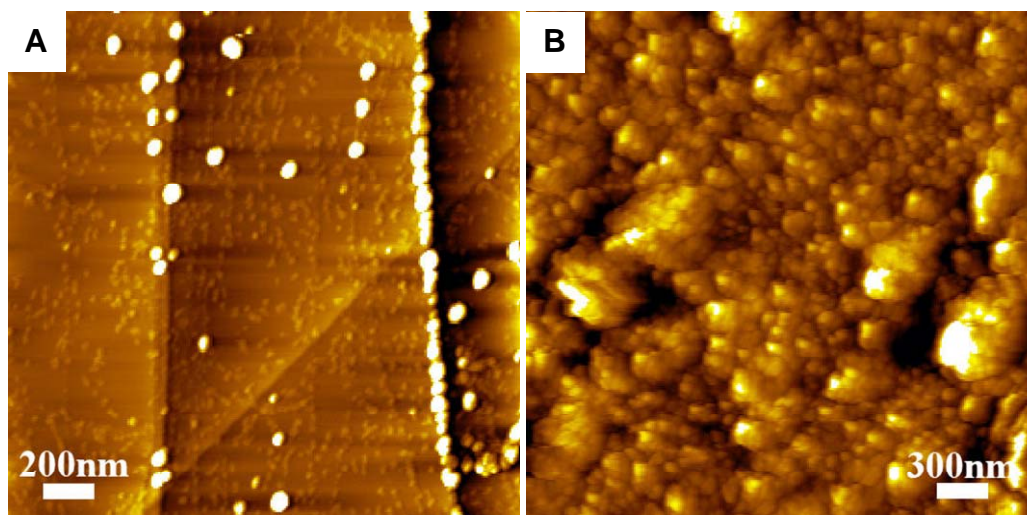


Figura 3.25 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após a aplicação do potencial de $-0,20$ V durante 30 min. numa solução de: A) $0,1$ mM e B) $1,0$ mM PdSO_4 .

Os depósitos visualizados no plano basal do eléctrodo, **Fig. 3.25A**, evidenciaram a formação dos pré-óxido de paládio, que por sua vez actuam como pontos de nucleação adicionais para a deposição do paládio.

A *electrodeposição de paládio em $E_{dep} = + 0,15$ V*. A electrodeposição neste potencial permitiu uma melhor avaliação dos pré-óxido de paládio formados na superfície do eléctrodo. Os voltamogramas registrados no electrólito de suporte após a electrodeposição em $0,1$ mM PdSO_4 mostraram correntes de pico muito pequenas, **Fig. 3.26**, enquanto que nas imagens de AFM foi possível observar agregados muito pequenos na superfície, mas cobrindo praticamente todo o eléctrodo, **Fig. 3.27A**. Após a electrodeposição a partir de $1,0$ mM PdSO_4 , foram observados nos voltamogramas os picos característicos para o paládio electrodepositado, muito bem definidos. As imagens de AFM, **Fig. 3.27B**, mostraram um filme formado por agregados globulares grandes, e com poros.

Com base nos resultados experimentais obtidos após a electrodeposição do paládio em $-0,20$ V e em $+ 0,15$ V, o par redox $4_c - 4_a$ foi relacionado com o processo de formação de pré-óxidos, sendo que as nanoestruturas observadas nestas condições, agregados e filmes, têm uma aparência muito diferente das nanoestruturas de $\text{Pd}(0)$, regulares, obtidas pela aplicação de potenciais muito mais negativos.

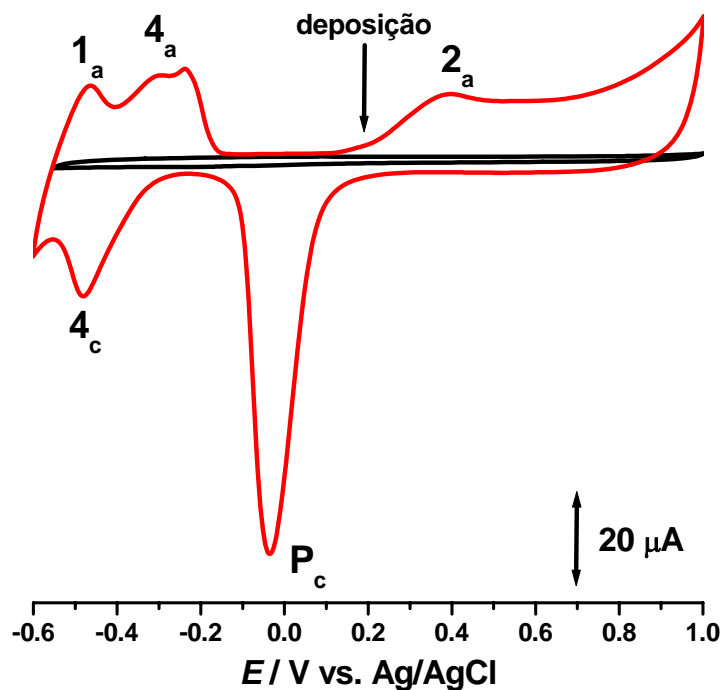


Figura 3.26 – Voltamogramas cíclicos obtidos em electrólito de suporte pH 7,0 após a aplicação do potencial de + 0,15 V durante 30 min. numa solução de:
 (—) 0,1 mM e de (—) 1,0 mM PdSO₄.

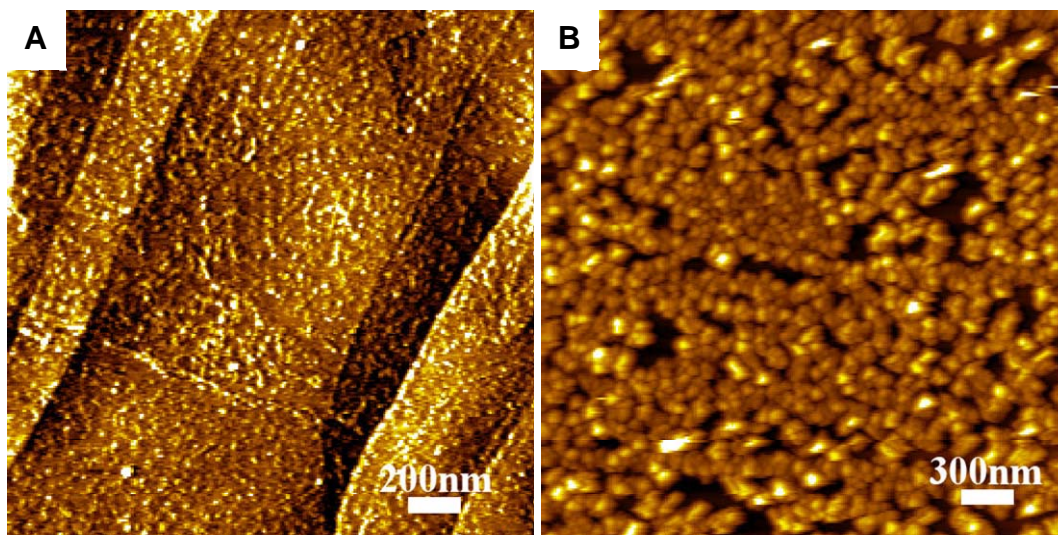


Figura 3.27 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após a aplicação do potencial de + 0,15 V durante 30 min. numa solução de:
 A) 0,1 mM e B) 1,0 mM PdSO₄.

A *electrodeposição de paládio em $E_{dep} = +1,00$ V*. Nos voltamogramas obtidos após a electrodeposição de 0,1 mM PdSO₄ foram observadas correntes de pico muito pequenas, **Fig. 3.28**, e as imagens de AFM mostraram apenas algumas partículas de 1,2 nm de altura, **Fig. 3.29A**.

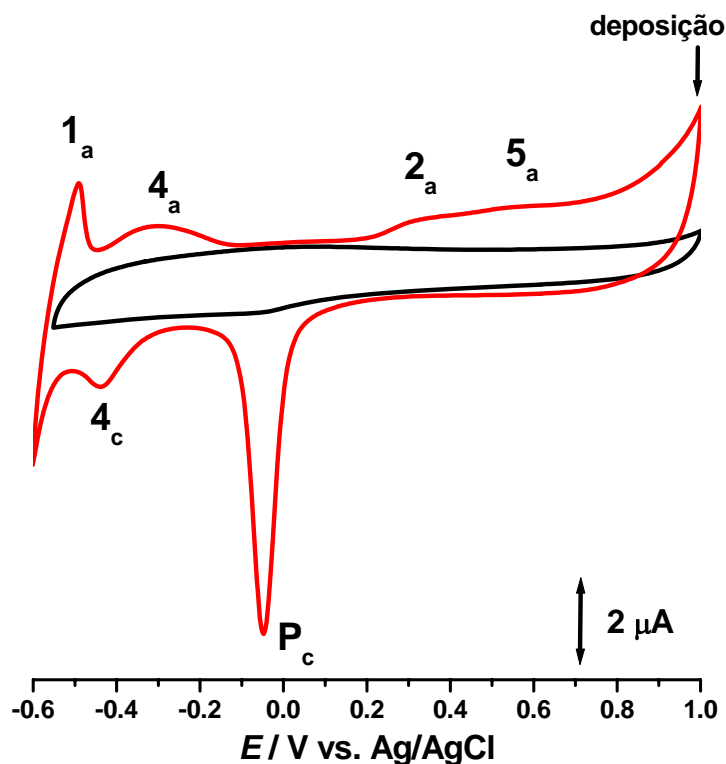


Figura 3.28 – Voltamogramas cíclicos obtidos em electrólito de suporte pH 7,0 após a aplicação do potencial de +1,00 V durante 30 min numa solução de:
(—) 0,1 mM e de (—) 1,0 mM PdSO₄.

A partir da solução de 1,0 mM PdSO₄, foram observados picos muito bem definidos nos voltamogramas registadas. De facto, nestas condições, o pico 1_a surgiu melhor definido e bem separado do par redox 4_c – 4_a. As imagens de AFM mostraram que o eléctrodo foi coberto por uma fina película uniforme, **Fig. 3.29B**, com apenas alguns poros de cerca de 1.5 nm de profundidade.

Ficou assim evidenciado que o crescimento da camada de óxidos de paládio começa a potenciais negativos com a formação de filmes de pré-óxidos de paládio, e o potencial onde este filme começa a ser formado depende directamente das características morfológicas das nanoestruturas de Pd(0) electrodepositado.

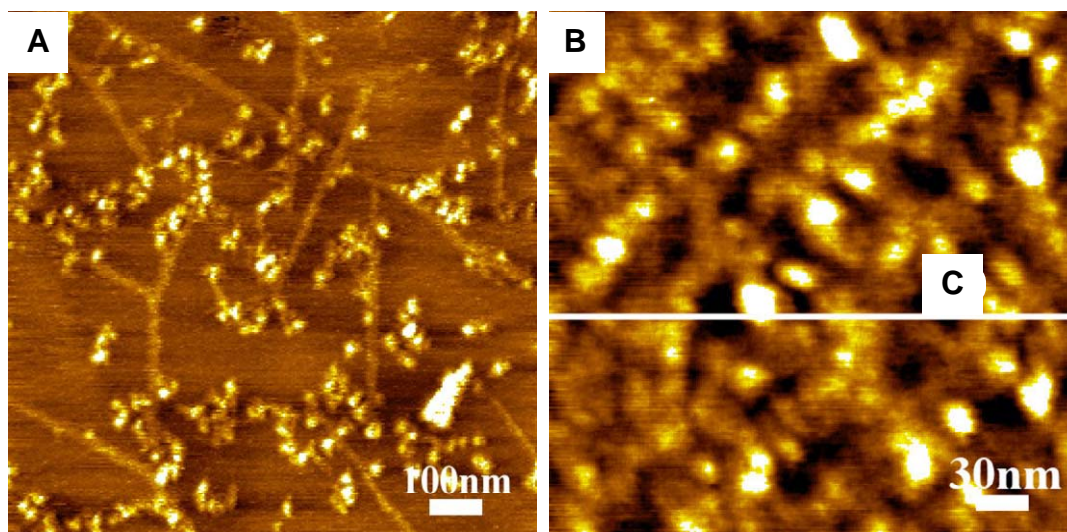


Figura 3.29 – Imagens de AFM [159] das nanoestruturas de paládio depositado na superfície do eléctrodo após a aplicação do potencial de + 1,00 V durante 30 min. numa solução de:
A) 0,1 mM e **B)** 1,0 mM PdSO₄.

Com a aplicação de potenciais positivos elevados, as nanopartículas e os nanofios de Pd(0) sofrem oxidação e conduzem à formação de uma camada mista de óxidos, que por sua vez proporciona pontos de nucleação para o crescimento adicional de Pd metal, aumentando a cobertura da superfície de eléctrodo.

No que respeita à formação de nanoestruturas regulares, bem definidas, ficou mostrado que o potencial aplicado influencia significativamente as características morfológicas das nanoestruturas de paládio, o controle do tamanho e da forma sendo conseguido através da variação dos parâmetros de electrodeposição

As dimensões e as formas dos nanofios de Pd(0) podem ser controlados através da redução da taxa de crescimento do Pd(0) utilizando o regime de UPD (- 0,45 V) e diminuindo a concentração da solução de paládio. Como resultado, o processo de UPD é um procedimento simples para a produção de nanofios de paládio uniformes em condições ambientais de pressão e temperatura. Pelo contrário, a formação de pequenas nanopartículas de Pd(0) com uma distribuição uniforme no eléctrodo requer uma electrodeposição rápida que pode ser alcançada em regime de OPD (- 1,00 V) e concentrações altas de Pd²⁺.

3.4 Nitrato de paládio e tetracloropaladato de potássio

O comportamento electroquímico do paládio foi também investigado por voltamétrie cíclica numa solução de 1,0 mM Pd(NO₃)₂ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturada com N₂. Os voltamogramas foram registados no intervalo de potencial - 1,0 V - + 1,00 V, com uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Os varrimentos sucessivos registados na solução de Pd(NO₃)₂ mostraram o comportamento electroquímico típico do paládio observado também para o PdCl₂ e o PdSO₄, **Fig 3.30**. Após 10 varrimentos em solução, o eléctrodo foi lavado e transferido para uma solução só de tampão fosfato a pH 7,0.

O primeiro varrimento registado em electrólito de suporte mostrou os mesmos picos observados em solução, mas deslocados para potenciais mais negativos e com correntes de pico menores, uma vez que o sinal electroquímico é proveniente só do paládio electrodepositado na superfície do GCE, sem a contribuição adicional das espécies presentes na solução.

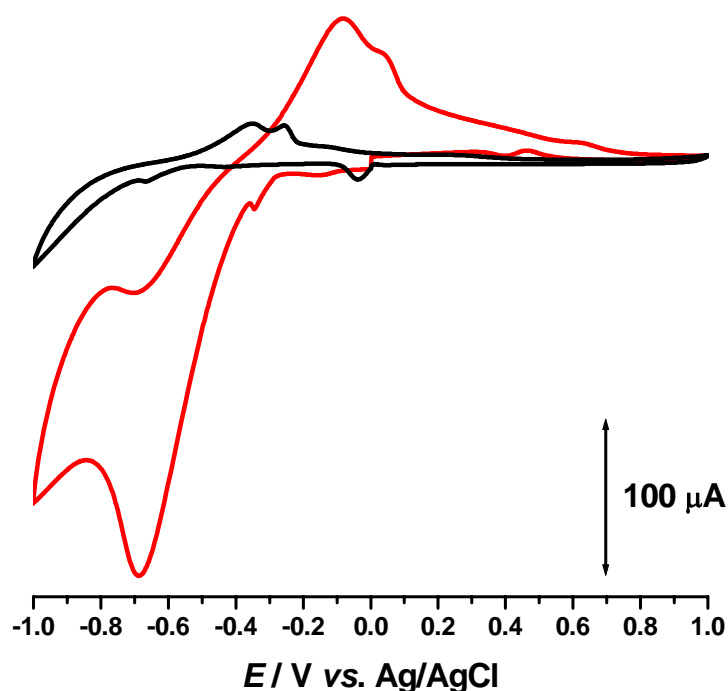


Figura 3.30 – Voltamogramas cíclicos: (—) 10^o varrimento numa solução de 1,0 mM Pd(NO₃)₂ e (—) 1^o varrimento após a transferência do GCE em electrólito de suporte pH 7,0.

Na **Fig. 3.31** está apresentado o último varrimento registado na solução de K_2PdCl_4 , e o primeiro varrimento registado em electrólito de suporte pH 7,0 após a transferência do eléctrodo. Neste caso foi observada a ausência do deslocamento de potencial dos picos e uma diferença menor entre as correntes registadas em solução e após a transferência em electrólito de suporte, devido à utilização de uma solução de K_2PdCl_4 menos concentrada do que para os estudos anteriores. Contudo, os voltamogramas mostram os picos característicos do paládio depositado na superfície do eléctrodo, ou seja, a formação dos óxidos de paládio nos potenciais positivos, a redução dos mesmos para o Pd(0) e a evolução do hidrogénio. Os resultados obtidos com $Pd(NO_3)_2$ e com K_2PdCl_4 mostraram que uma vez o paládio depositado na superfície do eléctrodo, por varrimentos sucessivos ou pela aplicação de um potencial fixo, o comportamento electroquímico é semelhante para todas as soluções precursoras utilizadas.

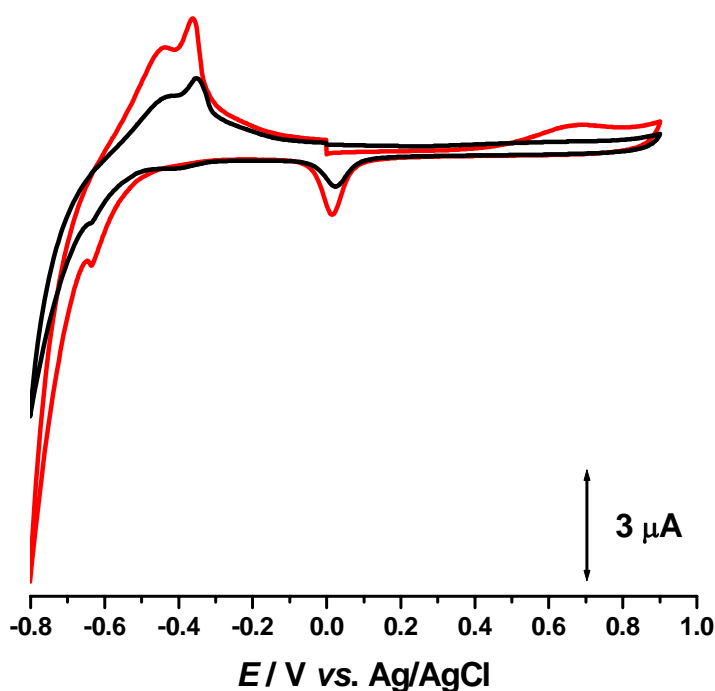


Figura 3.31 – Voltamogramas cíclicos: (—) 10º varrimento numa solução de 100 μM K_2PdCl_4 e (—) 1º varrimento após a transferência do GCE em electrólito de suporte pH 7,0.

O tetracloropaladato de potássio é o único sal de paládio que não necessita a solubilização em ácido e, sendo bem solúvel em meio aquoso, foi utilizado em seguida nas experiências de interacção dos iões de Pd^{2+} com o dsDNA.

3.5 A interacção dos iões de Pd²⁺ com o ADN

Diferentes iões metálicos interagem especificamente com o dsDNA, nos grupos de fosfato carregados negativamente da dupla hélice ou nas bases azotadas expostas nos sulcos [7, 121]. A interacção entre o dsDNA e os iões metálicos de Pd²⁺ foi estudada por voltametria de impulso diferencial para investigar a acção destes iões metálicos na possível indução de clivagem das pontes de hidrogénio no ADN, na deconformação da dupla hélice e / ou de provocar danos oxidativos às bases do ADN.

Foram utilizadas duas concentrações de Pd²⁺, que foram incubadas por diferentes períodos de tempo com dsDNA, e a interacção foi avaliada tanto em solução, como utilizando uma de camada fina do complexo Pd-ADN imobilizada na superfície do GCE por electrodeposição a + 0,30 V durante 300 s, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*.

O efeito da interacção paládio-ADN foi seguido por voltametria de impulso diferencial. As alterações observadas nas correntes dos picos de oxidação do dsDNA, as bases purínicas desoxiguanosina (dGuo), $E_{pa} = + 1.03$ V, e desoxiadenosina (dAdo), $E_{pa} = + 1.30$ V, foram comparadas com os resultados obtidos para uma solução de dsDNA de controle. Foi monitorizada a ocorrência dos picos associados aos produtos de oxidação da guanina e / ou adenina, ou seja, 8-oxoguanina e 2,8-dihidroxiadenina no potencial $E_p \sim + 0.45$ V vs. Ag/AgCl, em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, como indicador de dano oxidativo [62, 64] causado ao ADN. A solução de controle, de 60 mg mL⁻¹ dsDNA, foi preparada também em tampão acetato e analisada após os mesmos períodos de tempo que as soluções incubadas de Pd-ADN.

O potencial aplicado, + 0,30 V vs Ag / AgCl, é utilizado para a preparação de um filme fino de complexos Pd-ADN e foi seleccionado para reforçar a adsorção de ADN na superfície do eléctrodo. Contudo, o potencial aplicado é um potencial positivo abaixo do potencial de oxidação da qualquer base ou dos produtos de oxidação das bases [64] do ADN.

O complexo Pd-ADN foi preparado pela incubação de 60 mg mL⁻¹ de dsDNA com soluções de 10 e 100 μM Pd²⁺. Primeiro, a interacção de Pd²⁺ com o ADN foi estudada directamente nas soluções incubadas, **Fig. 3.32** e **Fig. 3.33**.

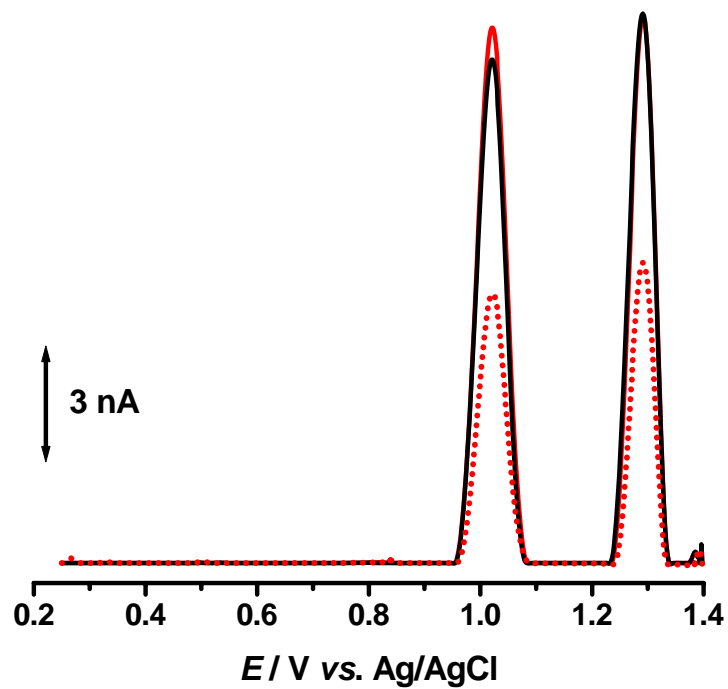


Figura 3.32 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) dsDNA de controle após 24 h da preparação, e complexo de Pd-ADN após (—) 24 h e (•••) 60 h de incubação com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$.

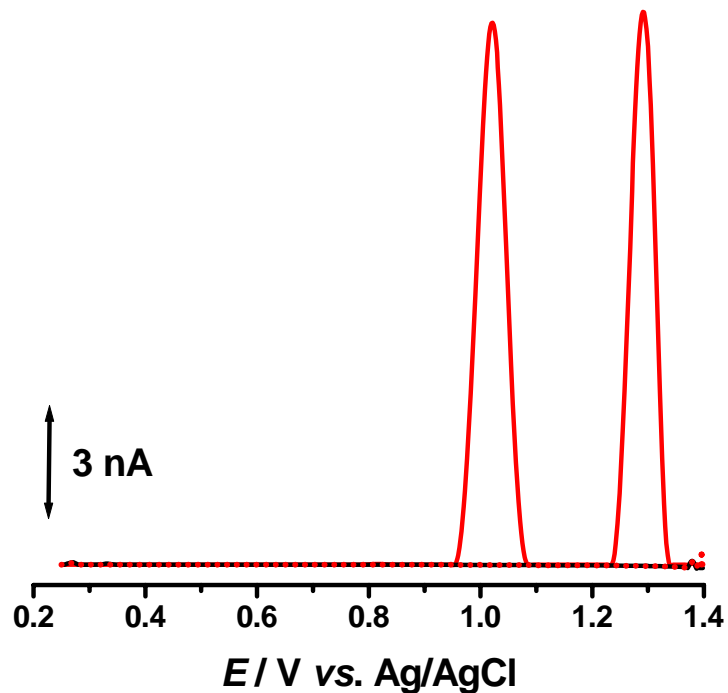


Figura 3.33 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) dsDNA de controle após 24 h da preparação, e complexo de Pd-ADN após (—) 24 h e (•••) 60 h de incubação com
A) $10 \mu\text{M}$ e B) $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$.

O voltamograma de impulso diferencial obtido em solução para o complexo de Pd-ADN após 24 horas de incubação do dsDNA com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$, **Fig. 3.32**, foi uma sobreposição quase perfeita com os resultados obtidos na solução de dsDNA de controle. Quando o voltamograma de impulso diferencial foi registrado na solução após 60 horas de incubação com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$, ocorreu uma diminuição considerável nas correntes dos picos de oxidação dGuo e dAdo, quando comparado com os resultados obtidos para a solução de dsDNA de controle.

A mesma experiência foi realizada utilizando uma solução mais concentrada de $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$. Os picos de oxidação do ADN, tanto dGuo como dAdo, desapareceram nos voltamogramas registados após 24 e 60 horas de incubação, **Fig. 3.33**, sugerindo uma interacção muito forte entre os iões de Pd^{2+} e o dsDNA. No entanto, como nos voltamogramas de impulso diferencial não foram observados picos correspondentes aos produtos de oxidação do dGuo ou dAdo, a 8-oxoguanina ou a 2,8-dihidroxiadenina, concluiu-se que para as condições experimentais utilizadas não houve dano oxidativo.

Numa outra experiência, foi preparado um filme fino do complexo Pd-ADN, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*, a partir duma solução de dsDNA incubada com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$ durante 24 e 60 horas, **Fig. 3.34**. Os voltamogramas registados em electrólito de suporte confirmaram a tendência das experiências anteriores nas soluções incubadas, ou seja, uma diminuição notável dos picos de oxidação dGuo e dAdo após 24h, no caso de soluções de dsDNA incubadas com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$, a ausência de picos após 60 horas e para as soluções de dsDNA incubadas com $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$ (não apresentado), mas nenhum dano oxidativo no ADN foi detectado.

Foram também efectuadas experiências com tempos curtos de incubação, utilizando o eléctrodo modificado com um filme de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, preparado como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*. O eléctrodo assim modificado foi imerso nas soluções de $10 \mu\text{M}$ e de $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 7,0, e os efeitos da interacção foram seguidos por voltametria de impulso diferencial após 3, 5 e 10 minutos de incubação. Os voltamogramas obtidos no electrólito de suporte pH 4,5, mostraram que para as incubações com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$, **Fig. 3.35**, os picos de oxidação dGuo e dAdo diminuíram com o aumento do tempo de incubação, relativamente aos picos registados para o filme de dsDNA de controle.

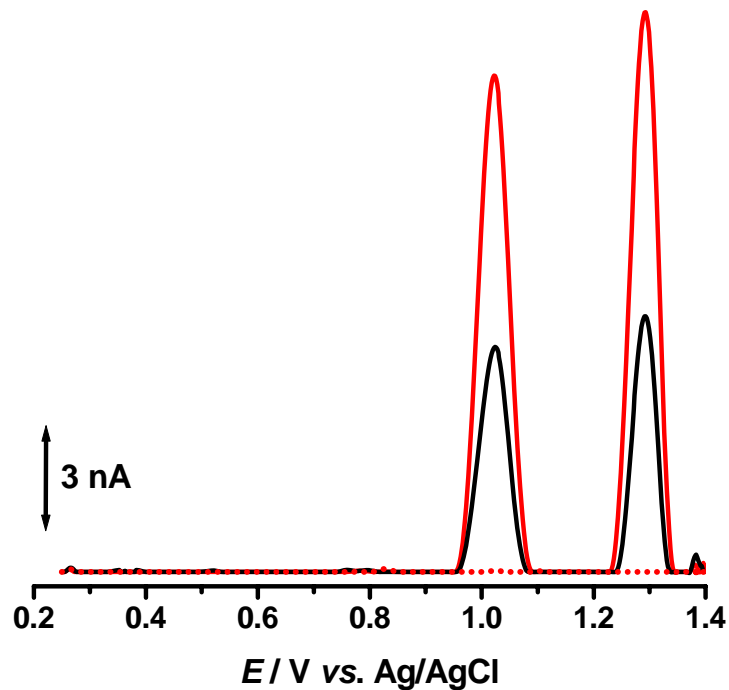


Figura 3.34 – Voltamogramas de impulso diferencial em electrólito de suporte pH 4,5 obtidos com um filme fino de: (—) dsDNA de controle após 24 h da preparação, e complexo de Pd-ADN com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$ após (—) 24 h e (•••) 60 h de incubação.

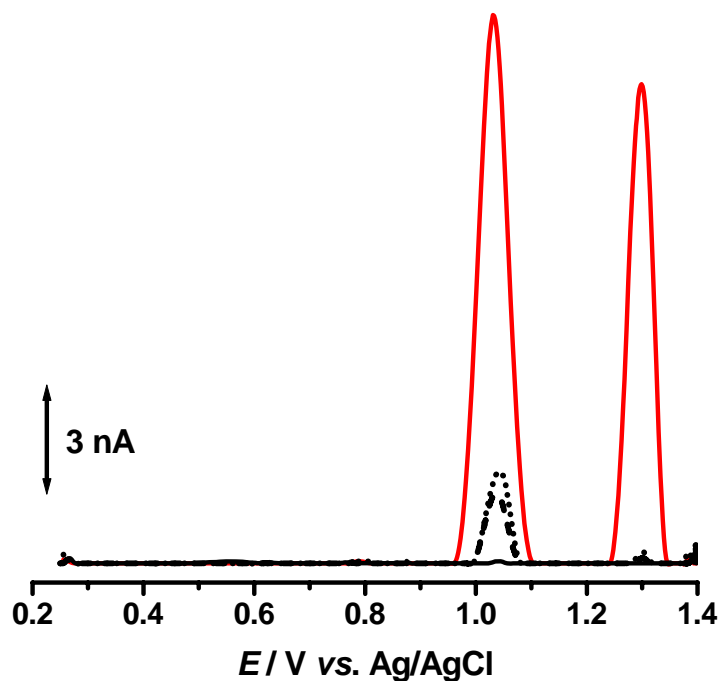


Figura 3.35 – Voltamogramas de impulso diferencial em electrólito de suporte pH 4,5 com filme de dsDNA: (—) de controle, e incubado por (—) 10 min, (---) 5min e (•••) 3 min. com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$.

No caso das incubações com $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$, **Fig. 3.36**, os voltamogramas mostraram a ausência dos picos de oxidação do ADN logo após 3 e 5 minutos de incubação. Quando o filme de dsDNA foi incubado por 10 minutos com $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$, o voltamograma registado apresentou um único pico de oxidação, $E_{pa} = +1,15 \text{ V}$.

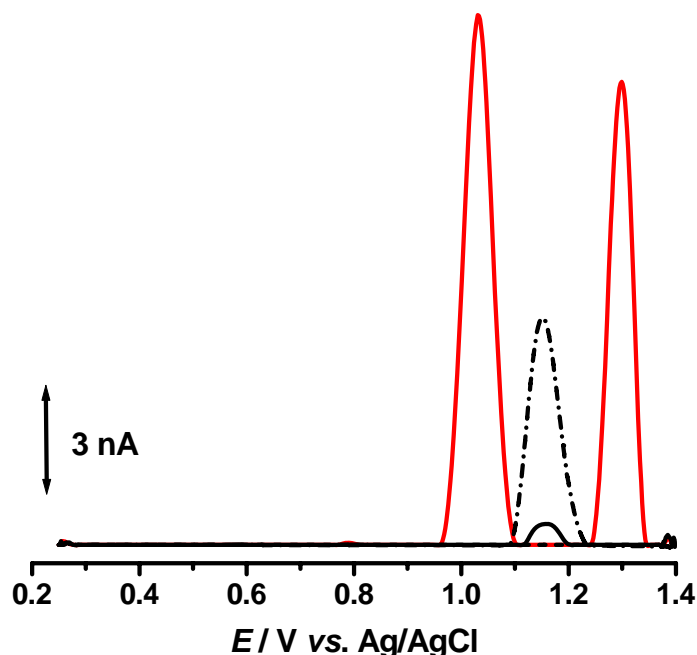


Figura 3.36 – Voltamogramas de impulso diferencial em electrólito de suporte pH 4,5 com filme de dsDNA: (—) de controle, e incubado por (—) 10 min. e (---) 5 min. com $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$ e (···) 10 min. adsorção livre de $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$.

Para esclarecer a ocorrência deste pico, foi efectuada uma experiência adicional na qual o eléctrodo previamente limpo foi imerso por 10 min numa solução de $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 7,0. O voltamograma registado em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,5, nas mesmas condições como para o filme de dsDNA incubado com Pd^{2+} , mostrou a presença do sinal anódico em $+1,15 \text{ V}$. Foi assim concluído que este pico é devido a oxidação do paládio adsorvido na superfície do eléctrodo, o que levou à identificação do pico registado no caso do filme de dsDNA incubado por 10 minutos com $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$. Todavia, também nestas experiências não foi detectado nenhum signal a $E_{pa} = +0,45 \text{ V}$ que poderia indicar o dano oxidativo causado ao ADN pelos iões de Pd^{2+} .

Os resultados obtidos mostraram que os iões de Pd^{2+} interagem com o dsDNA e que esta interacção é significativa, mesmo para concentrações muito baixas de $10 \mu\text{M}$ Pd^{2+} , quando comparado com a interacção do dsDNA com Pb^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} , que exigiu concentrações maiores destes iões metálicos [193].

Devido a uma elevada afinidade para formar ligações covalentes com as bases azotadas, vários catiões metálicos têm a capacidade de induzir mudanças estruturais no B-ADN [193], maiores no caso do dsDNA de alto peso molecular. A interacção das bases do ADN com Pd^{2+} mostrou ser mais forte do que com Ni^{2+} e Cd^{2+} . De facto, a ligação dos iões de Pd^{2+} ao ADN foi relatada a ser entre as mais fortes, em comparação com Pb^{2+} que é considerado de ter uma força de ligação de nível intermediário, e o Al^{3+} e Ce^{3+} de nível baixo [117, 122].

As experiências complementares de AFM [193] mostraram que os catiões de Pd^{2+} induziram grandes mudanças morfológicas no padrão de adsorção do ADN, quando comparado com o dsDNA de controle, **Fig. 3.36A**, nas mesmas condições experimentais. As imagens do complexo de Pd-ADN adsorvido no HOPG, **Fig. 3.36B e C**, mostraram uma rede constituída por filamentos espessos e enrolados que se uniram para formar agregados, deixando grandes partes da superfície do eléctrodo descoberta. A espessura da camada do complexo Pd-ADN apresentou valores que variaram entre 2,0 e 13,0 nm, maiores do que a altura do dsDNA de controle de 2,0 nm [193], o que significa que várias camadas de hélices de ADN estão envolvidas num processo de condensação.

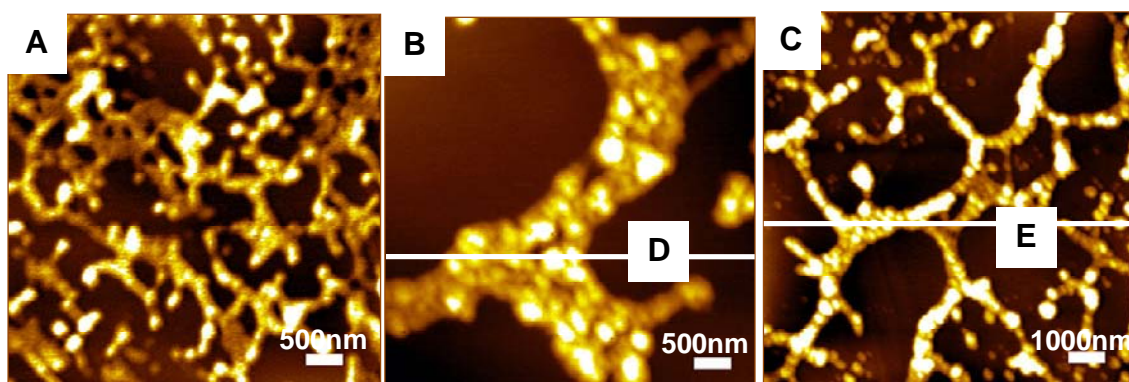


Figura 3.36 – Imagens de AFM [193] de: **A)** dsDNA controle, e **B, C)** complexo Pd-ADN.

Os resultados voltamétricos, confirmados também por AFM, são coerentes com o modelo proposto [117, 118, 127] para descrever as interações do dsDNA com os catiões metálicos, baseado na ligação específica com as bases do dsDNA. Estes catiões metálicos interagem com os grupos fosfato do dsDNA e com as bases, sendo o N7 das purinas o local mais provável de ligação. A ligação dos catiões metálicos nestes sítios primários destabiliza localmente o dsDNA, causando o desenrolamento da dupla hélice, com as bases deslocadas em relação ao eixo da hélice, e perturbando o emparelhamento e o empilhamento das bases no ADN. Na sequência deste mecanismo, a dupla hélice de ADN torna-se localmente desnaturada. Como resultado, sítios secundários de ligação estão disponíveis para reagir, como o N1 da adenina, o N1H da guanina, o N3 da citosina e o N3H da timina, permitindo a ligação adicional dos iões metálicos.

A separação local das cadeias do ADN pode induzir também um estado de agregação parcial na presença de catiões metálicos. As cadeias parcialmente abertas, com as bases desemparelhadas devido à perturbação, podem realizar ligações cruzadas com as cadeias presentes na vizinhança através de pontes de iões metálicos. Na presença de alguns metais de transição, a agregação do ADN de alto peso molecular foi anteriormente observada mesmo à temperatura ambiente [121, 127]. A agregação do ADN está dependente da desnaturação local e, conseqüentemente, os catiões metálicos que exibem uma maior afinidade para as bases do ADN, especialmente para o N7 das purinas, favorecem uma maior agregação.

Devido à desnaturação local da dupla hélice, as bases que inicialmente foram protegidas no interior da hélice são mais expostas para a solução e sofrem mais facilmente interações hidrofóbicas com a superfície hidrofóbica dos eléctrodos de carbono, quando comparado com o dsDNA de controle. A forte interação dos iões de Pd^{2+} com o dsDNA leva a desnaturação que é rapidamente seguida pela agregação do ADN, devido à formação de pontes de iões metálicos entre as bases das cadeias vizinhas.

Os resultados de voltametria obtidos com o complexo de Pd-ADN mostraram a diminuição dos sinais de tanto dGuo e dAdo nas soluções incubadas com $10 \mu\text{M Pd}^{2+}$, e a ausência de sinais quando uma concentração maior de $100 \mu\text{M Pd}^{2+}$ foi utilizada. Isto é consistente com os fenómenos descritos de condensação e agregação do ADN.

O efeito significativo da interacção do dsDNA com os iões de Pd^{2+} , observado por voltametria e AFM, demonstra uma modificação total da forma secundária de estrutura B-ADN, de acordo com um fenómeno observado anteriormente na presença de Pd^{2+} por espectroscopia Raman [117].

As estruturas de Pd-ADN muito compactas observadas por AFM [193], e os resultados voltamétricos, sugerem que as interacções do Pd^{2+} com o ADN estão localizadas no interior da dupla hélice, o que conduz a uma interacção forte e estável entre Pd^{2+} e as bases do ADN. A interacção é dependente do tempo de incubação e das concentrações de Pd^{2+} utilizadas, e altera completamente a forma secundária de estrutura B-ADN, mas não causando dano oxidativo.

3.6 Conclusões

A caracterização voltamétrica do paládio em solução e electrodepositado em substratos de carbono, a partir de soluções de PdCl_2 , PdSO_4 , $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e K_2PdCl_4 , mostrou um comportamento electroquímico complexo, envolvendo vários processos redox, correlacionados com a formação de nanoestruturas. Através do controlo de diferentes parâmetros, tais como o potencial aplicado e a concentração das soluções utilizadas, foram obtidas várias nanoestruturas (nanopartículas, nanofios e filmes), com possíveis aplicações em electrocatálise e em nanotecnologia.

Os iões de Pd^{2+} interagem especificamente com o dsDNA e os resultados voltamétricos mostram que a interacção é muito rápida e estável, relacionada com a indução de desnaturação local da dupla hélice e mudanças estruturais da forma de B-ADN, mas sem causar danos oxidativos.

CAPÍTULO 4

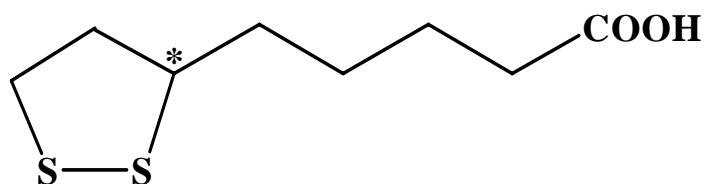
ESTUDO ELECTROANALÍTICO DO ÁCIDO α -LIPÓICO

Neste capítulo será descrito o ácido α -lipóico, antioxidante e ligando, e será efectuada uma caracterização por voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de impulso diferencial. Será descrito o mecanismo de oxidação do ácido α -lipóico e serão optimizadas as condições para determinar o seu conteúdo em duas amostras comerciais.

O conteúdo em ácido lipóico em dois suplementos nutritivos, um xarope que contem o ácido α -lipóico e cápsulas de ácido α -lipóico, será determinado directamente no eléctrodo de carbono vítreo pela voltametria de impulso diferencial utilizando o método de adição padrão.

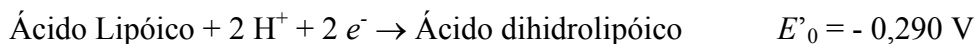
4.1 Introdução

O ácido α -lipóico, cuja estrutura está representada no **Esquema 4.1**, tem um anel ciclopentano que inclui uma ponte dissulfídica, uma curta cadeia aquil com quatro unidades CH_2 , e uma terminação carboxílica.



Esquema 4.1 – Fórmula estrutural do ácido α -lipóico

A reacção bioquímica do ácido lipóico envolve a redução reversível da ponte dissulfídica do anel ciclopentano a um ditiol, resultando o ácido dihidrolipóico (DHHLA – “dihydrolipoic acid”):



As propriedades especiais do ácido lipóico devem-se às propriedades do ácido lipóico na sua forma oxidada. A configuração de anel fechado é energeticamente superior à forma de cadeia aberta, o que resulta num forte potencial negativo de redução de cerca de -0,30 V. A forma oxidada oxida facilmente cianetos e grupos sulfidril [8]. A reacção de redução do ácido lipóico é reversível no eléctrodo de mercúrio ou nos eléctrodos modificados com sais orgânicos de metais com quais o ácido lipóico pode realizar complexos [278].

O ácido lipóico na forma oxidada também pode sofrer oxidação nos átomos de enxofre. Esta oxidação conduz à formação de um tiosulfinato, produto biológico identificado como ácido β -lipóico [254], ou de um tiosulfonato [257, 266].

O comportamento electroquímico do ácido α -lipóico foi estudado num largo intervalo de valores de pH, de 1,4 – 10,6. A resposta voltamétrica foi registrada num intervalo de potencial – 1,00 V – + 1,40 V, e estudou-se também a influência do pH no processo de transferência de carga envolvido na sua oxidação.

4.2 Voltametria cíclica

O comportamento electroquímico de oxidação do ácido α -lipóico foi estudado inicialmente em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Os voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de 100 μM ácido α -lipóico, registados a uma velocidade de 25 mV s^{-1} , estão apresentados na **Fig. 4.1** e mostram um único pico anódico em $E_{\text{pa}} = +0,80 \text{ V}$.

Varrimentos sucessivos na mesma solução mostraram uma diminuição da corrente nos voltamogramas e de seguida uma estabilização da corrente do pico. Os voltamogramas mostram também a ausência de quaisquer outros picos devido à formação de produtos de oxidação electroactivos nos varrimentos seguintes.

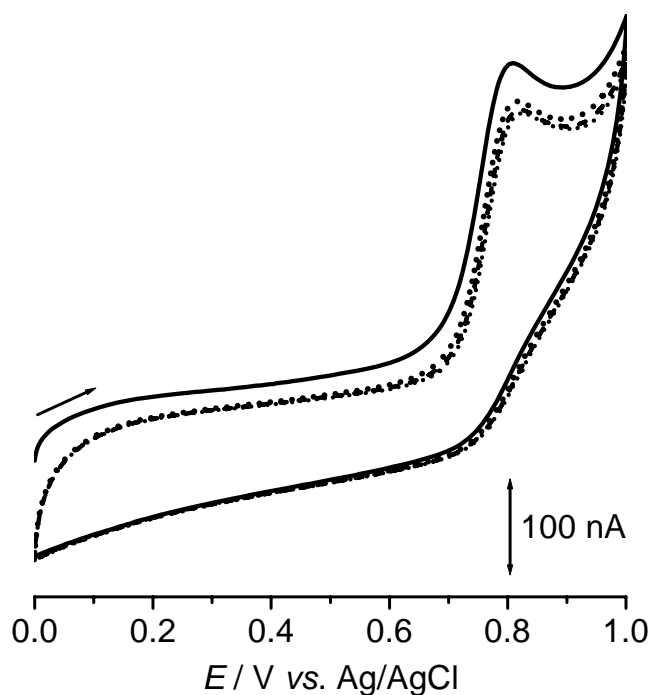


Figura 4.1 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de uma solução de 100 μ M ácido α -lipóico em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

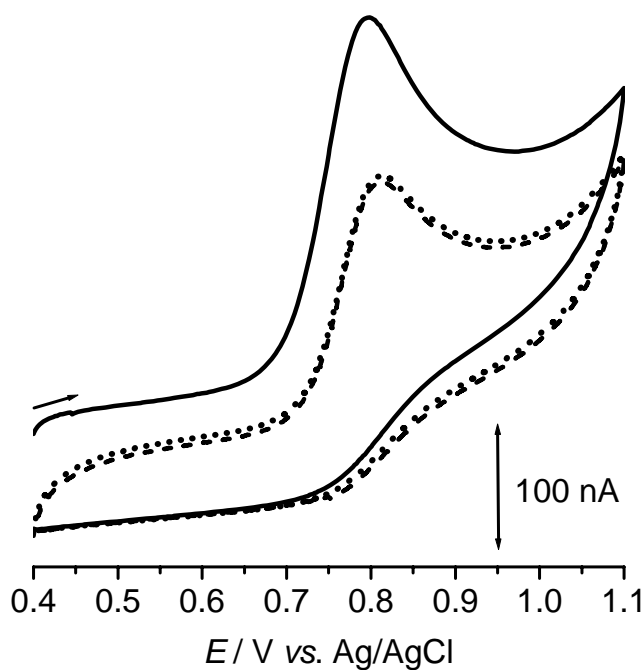


Figura 4.2 – Voltamogramas cíclicos sucessivos de uma solução de ácido 100 μ M α -lipóico em tampão acetato 0,1 M pH 4,5; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

O mesmo comportamento foi observado nos voltamogramas cíclicos registados a pH 4,5 numa solução de ácido α -lipóico 100 μ M em tampão acetato 0,1 M, **Fig. 4.2**, mas com o pico de oxidação mais definido e com uma corrente maior.

O efeito do pH no potencial do pico de oxidação, E_{pa} , **Fig. 4.3**, foi estudado em diferentes electrólitos de suporte com força iónica de 0,1 M para uma larga gama de valores de pH, de 1,4 a 10,6. Os resultados mostram correntes do pico maiores em meio ácido e diminuindo em meio neutro e alcalino. A largura do pico aumentou com o aumento dos valores de pH, enquanto o potencial de oxidação se manteve com o mesmo valor.

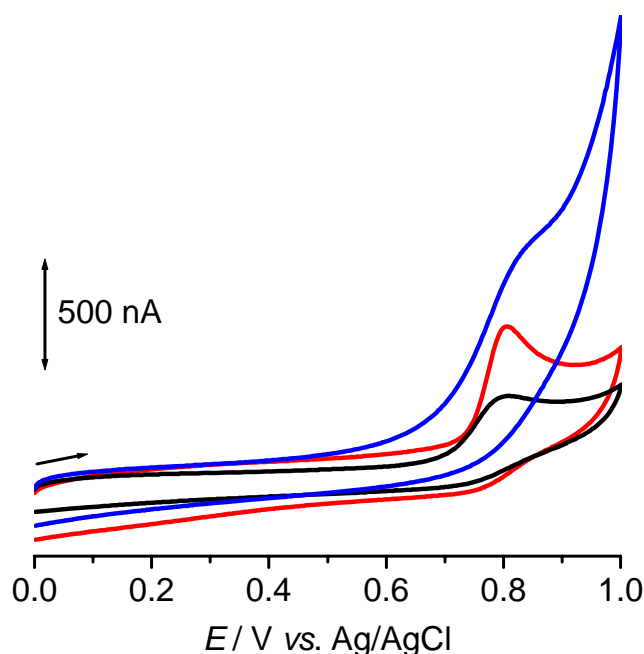


Figura 4.3 – Voltamogramas cíclicos numa solução de 100 μ M ácido α -lipóico em diferentes electrólitos de suporte 0,1 M: (—) pH 1,4, (—) pH 7,0 e (—) pH 10,6; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Voltamogramas cíclicos obtidos a pH 7,0 numa solução de 100 μ M ácido α -lipóico em tampão fosfato 0,1 M foram registados a diferentes velocidades de varrimento, entre 10 mV s^{-1} e 1 V s^{-1} . Com o aumento da velocidade de varrimento foi observado um deslocamento do pico de oxidação para potencias mais positivos, tanto como o aumento da corrente capacitiva, **Fig. 4.4**.

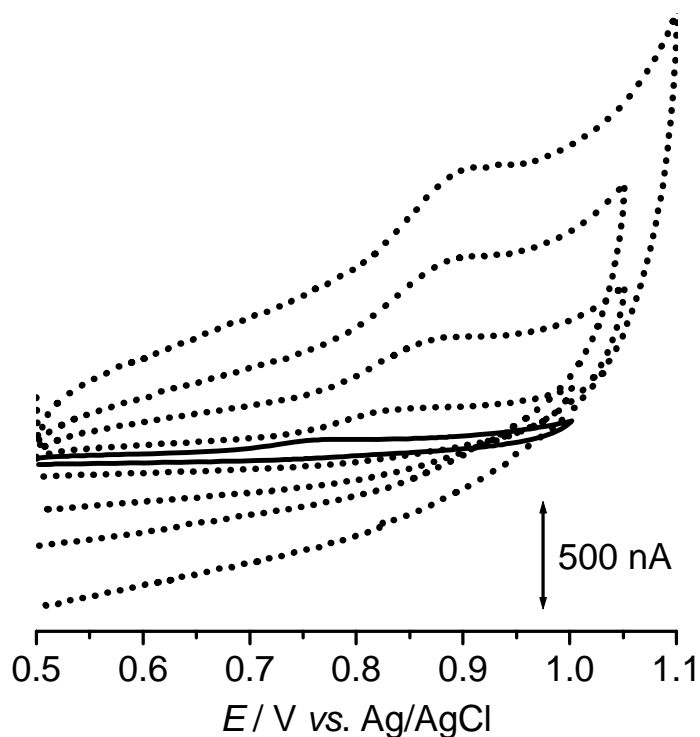


Figura 4.4 – Voltamogramas cíclicos numa solução de 100 μM ácido α -lipóico em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 à diferentes velocidades de varrimento, $\nu = 10; 50; 200; 400$ e 750 mV s^{-1} .

Para um sistema irreversível controlado pela difusão:

$I_{pa} = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_a n')^{1/2} A [O]_{\infty} D_0^{1/2} \nu^{1/2}$, onde α_a é o coeficiente anódico de transferência de carga electroquímica, n' é o número de electrões transferidos na etapa determinante, $[O]_{\infty}$ é a concentração em mol cm^{-3} , e ν a velocidade de varrimento em V s^{-1} [318].

O valor do coeficiente de difusão determinado para o ácido α -lipóico foi $D_0 = 1.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, muito próximo do valor encontrado por Rogers e Mallett [277].

A área do eléctrodo de carbono vítreo foi previamente determinada ser $A = 0,010 \text{ cm}^2$, obtida através da voltametria cíclica de uma solução de 0,5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, onde o coeficiente de difusão do hexacianoferato de potássio é $7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [331].

4.3 Voltametria de impulso diferencial

O processo de oxidação electroquímica do ácido α -lipóico foi estudado na mesma escala do pH por voltametria de impulso diferencial. A resposta voltamétrica foi obtida em soluções de 5 μ M ácido α -lipóico em diferentes electrólitos de suporte com a força iónica de 0,1 M. Os resultados mostraram somente a presença de um pico anódico em todas as soluções de electrólito de suporte utilizados, **Fig. 4.5**, e confirmaram que o processo de oxidação do ácido α -lipóico é independente de pH, **Fig. 4.6**.

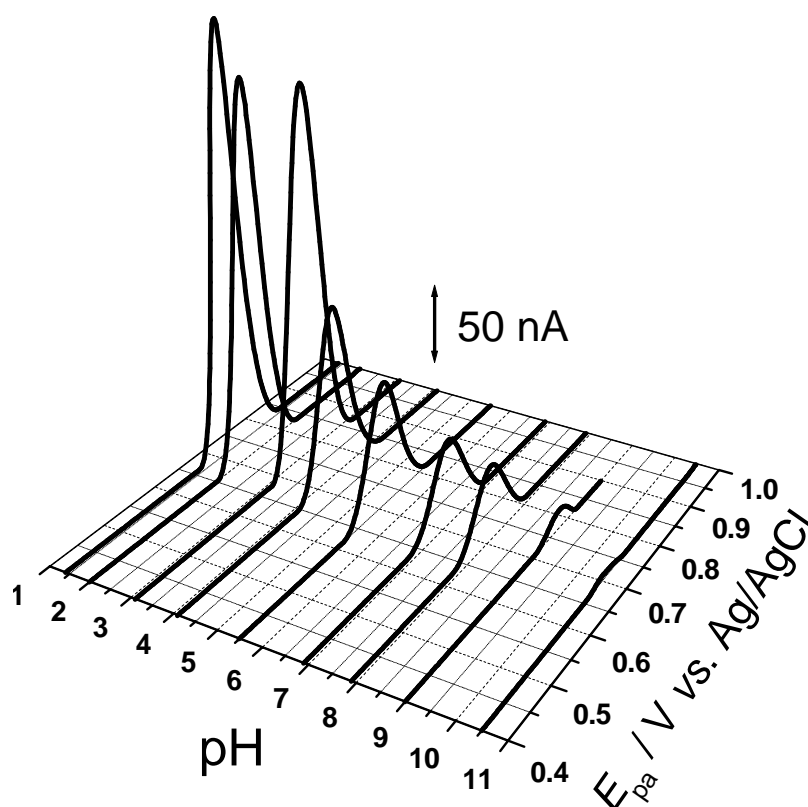


Figura 4.5 – Voltamogramas de impulso diferencial de 5 μ M ácido α -lipóico em função de pH e do potencial de oxidação [221].

O número de electrões foi calculado da largura na meia-altura $W_{1/2} = 3,52 RT/nF$ (Brett, 1993) dos voltamogramas de impulso diferencial gravados, onde $W_{1/2} = 87$ mV; resulta que ocorre a transferência de carga de um só electrão e nenhum protão está

envolvido na oxidação, sendo um processo independente de pH. O gráfico da variação da corrente do pico com o pH, **Fig. 4.6**, mostra que as correntes mais elevadas foram registadas em meio ácido, na solução do electrólito suporte de KCl + HCl 0,1 M pH 1,4, e que as correntes diminuíram com o aumento de pH.

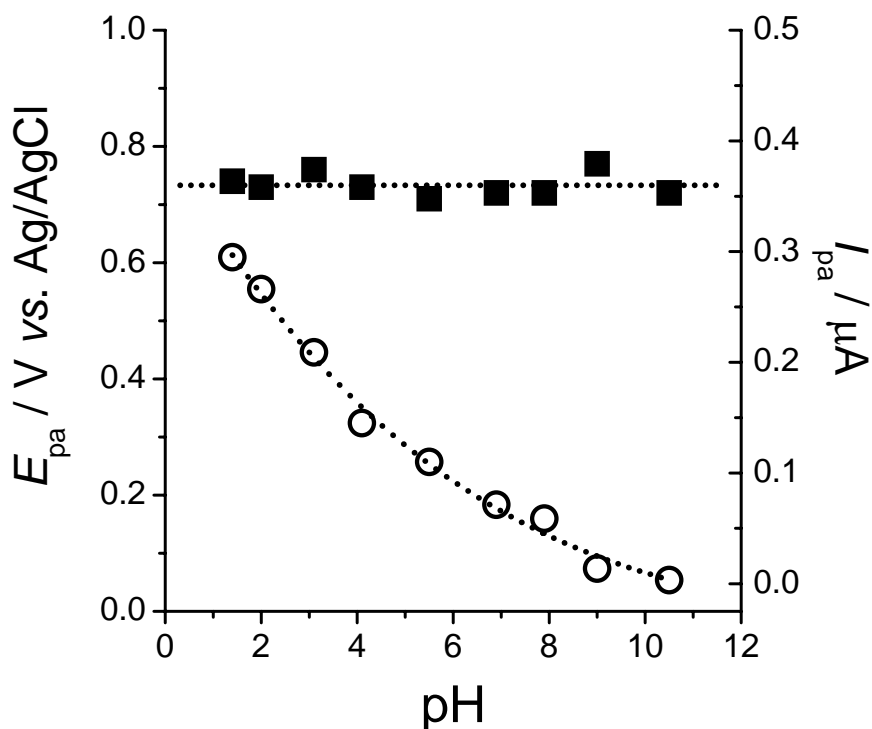


Figura 4.6 – Dependência de (■) E_{pa} e (○) I_{pa} do pico de oxidação com o pH para uma solução de 5 μ M ácido α -lipóico [221].

Voltamogramas de impulso diferencial sucessivos foram registados numa solução de 5 μ M em tampão acetato de 0,1 M pH 4,1, a fim de confirmar o comportamento observado pela voltametria cíclica, ou seja, uma diminuição na corrente do pico de oxidação nos primeiros três varrimentos consecutivos, mas depois o pico manteve a mesma altura **Fig. 4.7A**. O comportamento sugere que o ácido α -lipóico adsorve na superfície do eléctrodo de carbono vítreo, mas sem a formação de produtos de oxidação, sendo que não foram observados quaisquer picos correspondentes a produtos de oxidação electroactivos.

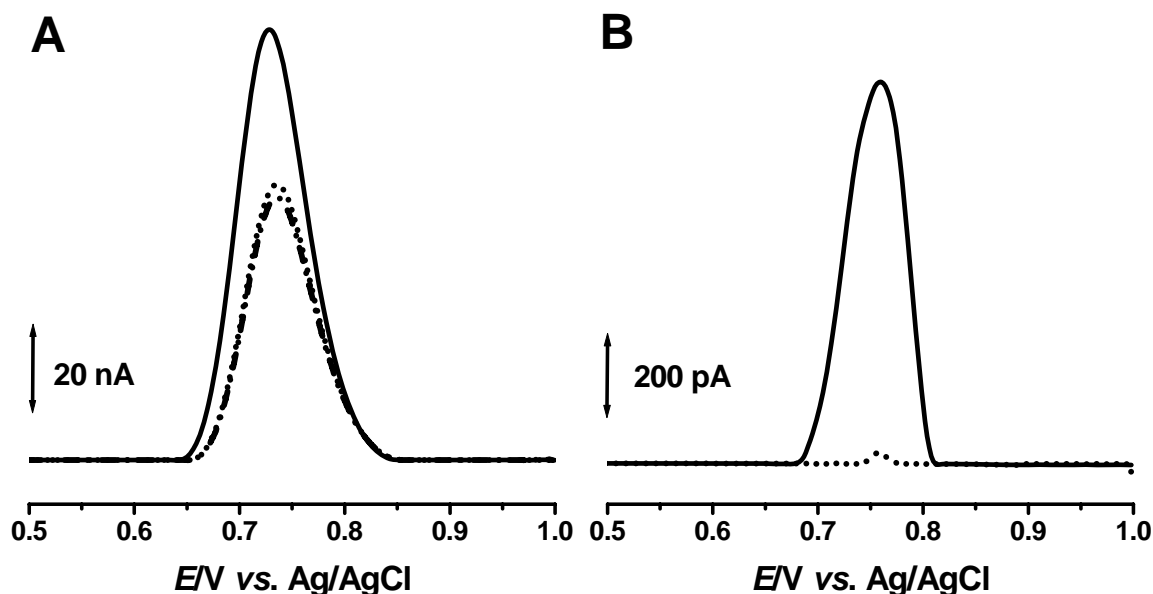


Figura 4.7 – Voltamogramas de impulso diferencial: **A)** (—) primeiro, (•••) segundo e (•—•) terceiro varrimento na solução de 5 μM ácido α -lipóico em tampão acetato pH 4,1, e **(B)** (—) primeiro e (•••) segundo varrimento no electrólito de suporte pH 4,1.

A adsorção do ácido α -lipóico na superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi confirmada após a transferência do eléctrodo para uma solução somente de electrólito suporte. Depois de alguns varrimentos na solução do ácido α -lipóico, o eléctrodo foi lavado com água desionizada e transferido para a solução tampão onde os voltamogramas de impulso diferencial foram registados. Os voltamogramas mostraram a presença do pico de oxidação do ácido α -lipóico no mesmo potencial que na solução de ácido α -lipóico, mas com uma corrente de pico muito pequena. O segundo varrimento registado mostra a ausência do pico da adsorção do ácido α -lipóico, **Fig. 4.7B**.

O comportamento electroquímico em electrólito de suporte do ácido α -lipóico adsorvido na superfície do eléctrodo é consistente com o comportamento do ácido α -lipóico na solução, tendo correntes de pico mais elevadas em meios ácidos e diminuindo com o aumento das valores de pH. Já para o pH neutro o pico é visível somente após o tratamento matemático dos voltamogramas, com a subtração e a correção da linha de base (não apresentado).

4.4 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada mostraram resultados semelhantes aos de voltametria cíclica e de impulso diferencial, ou seja, um pico de oxidação irreversível e a independência de pH do processo de oxidação do ácido α lipóico.

O voltamograma registado numa solução de 5 μ M ácido α -lipóico em tampão acetato 0,1 M pH 3,1 mostrou o pico da oxidação a $E_{pa} = + 0,76$ V, e nenhum pico reversível foi observado na corrente inversa **Fig. 4.8**. Ao transferir o eléctrodo para o electrólito de suporte, os voltamogramas mostraram a presença do pico de oxidação do ácido α -lipóico adsorvido e a irreversibilidade do mesmo.

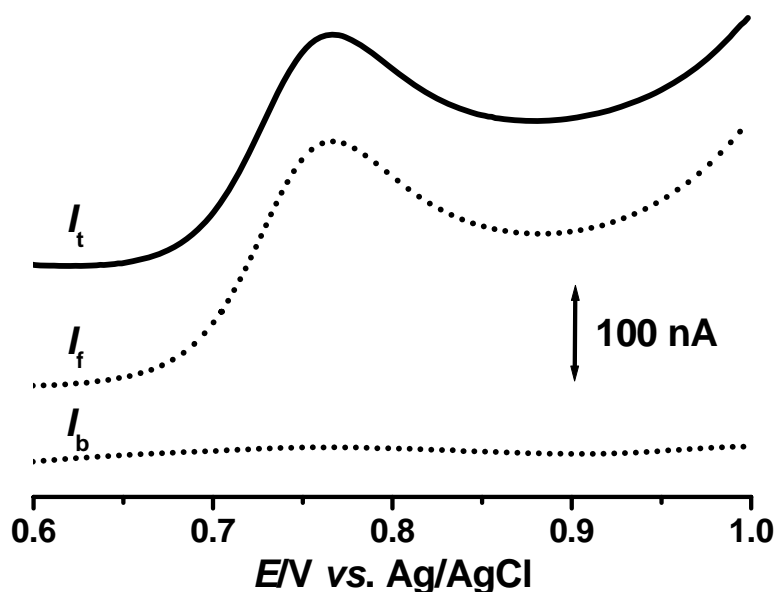
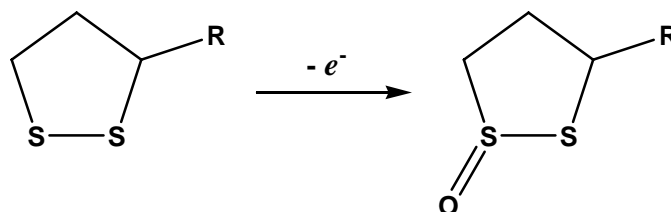


Figura 4.8 – Voltamograma de onda quadrada numa solução de 5 μ M ácido α -lipóico em tampão acetato 0,1 M pH 3,1. I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa. Frequência 13 Hz, amplitude 50 mV, velocidade efectiva do varrimento 15 mV s^{-1} .

Os dados adquiridos conduzem à conclusão que, durante o varrimento para potenciais positivos elevados, o ácido lipóico é oxidado de maneira irreversível a ácido β -lipóico. O pico corresponde à oxidação de um dos átomos de enxofre da ponte dissulfídica a um tiosulfinato, sendo que nenhuns protões estão envolvido na reação,

mas não ao thiosulfonato, tendo em consideração que o processo de oxidação ocorre com transferência somente de um elétron.



Esquema 4.2 – Mecanismo de formação do ácido β - lipóico

4.5 Determinação analítica do ácido α -lipóico

A detecção do ácido α -lipóico no eléctrodo de carbono vítreo oxidando-o irreversivelmente ao ácido β -lipóico poderia ser uma maneira simples e menos demorada para determinar a sua presença em suplementos nutritivos, sendo que não exige soluções desaeradas ou eléctrodos modificados.

Embora em meios ácidos o ácido α -lipóico adsorva na superfície do eléctrodo, não é uma adsorção forte e o ácido lipóico é removido facilmente lavando o eléctrodo com o álcool etílico, seguido por uma limpeza electroquímica de poucos varrimentos no electrólito de suporte.

Para a determinação analítica, voltamogramas de impulso diferencial da oxidação do ácido α -lipóico foram registados na mesma superfície do eléctrodo de carbono vítreo em soluções com diferentes concentrações de ácido α -lipóico, de 1 μ M a 150 μ M, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

Antes de cada medida a superfície do eléctrodo foi lavada com álcool etílico e ciclado no electrólito de suporte, entre os mesmos potenciais que os da medida, até ser obtida uma linha de base limpa e constante. Voltamogramas de impulso diferencial obtidos para várias concentrações do ácido lipoic são mostrados na **Fig. 4.9**.

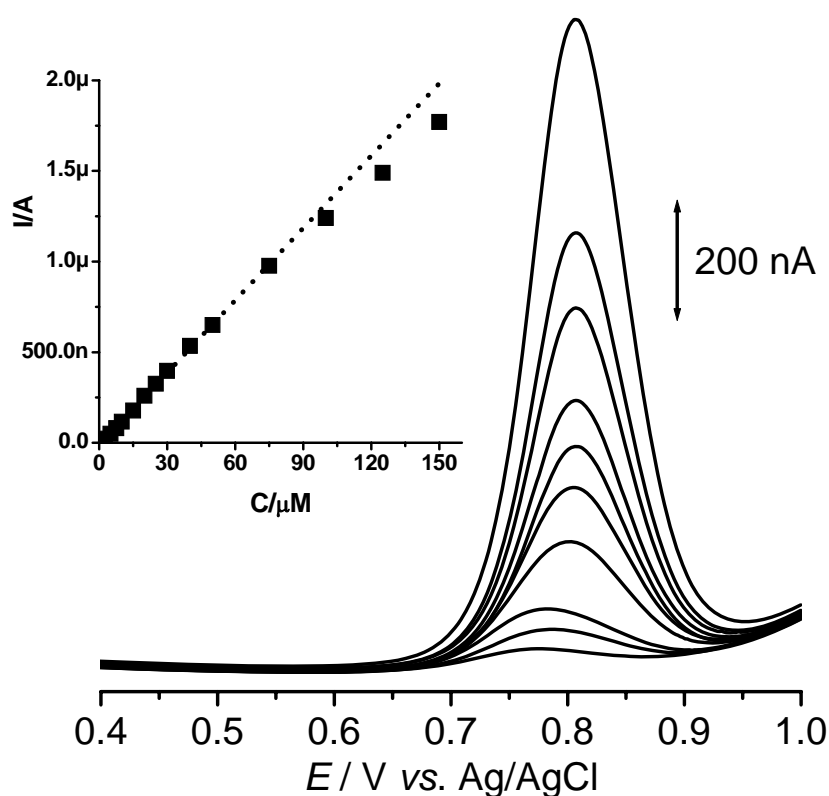


Figura 4.9 – Voltamogramas de impulso diferencial do ácido α -lipóico de 2,5 a 75 μM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e curva de calibração (inserido).

Para obter a precisão do método, três medidas para cada concentração foram executadas. Os dados permitiram o cálculo da curva de calibração:

$$I/\text{A} = -1,18 \times 10^{-8} + 0,0133C/\text{M} \quad (R = 0,9997; \text{SD} = 8,12 \times 10^{-9} \text{ A}; N = 12 \text{ e } P < 0,0001).$$

Uma boa linearidade para a oxidação do ácido α -lipóico foi encontrada para concentrações abaixo de 75 μM . O limite de detecção (LOD), baseado em três vezes o nível de ruído, foi determinado a ser $1,8 \times 10^{-6} \text{ M}$, e o limite da quantificação (LOQ), baseado em dez vezes o nível de ruído, foi $6,1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

A única desvantagem em determinar o ácido α -lipóico nos alimentos e suplementos nutritivos por meios electroquímicos num eléctrodo de carbono vítreo seria a possível interferência com outros componentes presentes nas amostras naturais que também têm uma resposta anódica.

4.6 Detecção do ácido α -lipóico em amostras comerciais

O conteúdo de ácido lipóico em dois suplementos nutritivos, *Poly-MVA*TM e *Solgar-ALA*, foi determinado pela voltametria de impulso diferencial utilizando o método de adição padrão. Os resultados estão apresentados na **Fig. 4.10** e na **Tabela 4.1**.

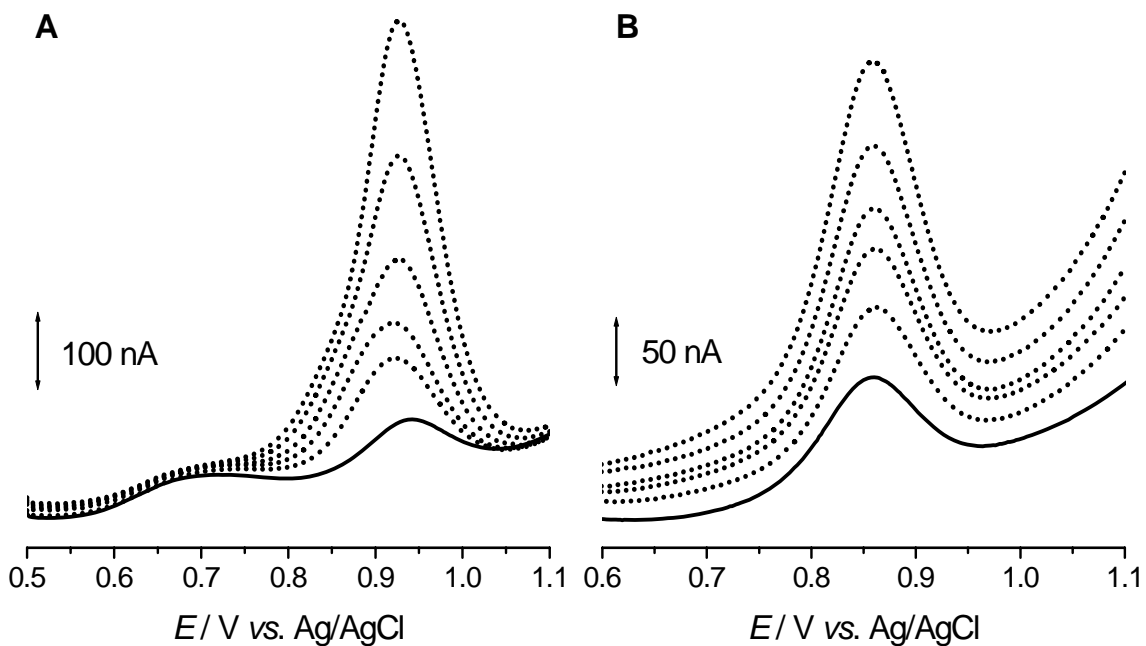


Figura 4.10 – Voltamogramas de impulso diferencial: (•••) adição de ácido α -lipóico padrão e **A)** (—) *Poly-MVA*TM, **B)** (—) *Solgar-ALA*.

O *Poly-MVA*TM é um suplemento nutritivo líquido e foi utilizado directamente após a mistura com o electrólito de suporte. Um volume de 10 μ l foi retirado do recipiente de 236 ml de *Poly-MVA*TM e diluído 50 vezes com o tampão de fosfato de pH 7,0. O primeiro voltamograma (linha contínua) na **Fig. 4.10A** mostra a resposta voltamétrica do conteúdo do suplemento nutritivo *Poly-MVA*TM e apresenta dois picos de oxidação. Os varrimentos seguintes foram registados após ter adicionado quantidades conhecidas do ácido α -lipóico, e somente a corrente do segundo pico aumentou com o aumento das quantidades de ácido α -lipóico padrão.

O conteúdo de ácido α -lipóico na amostra foi estimado pela recta de intercepção no eixo X após ter traçado a resposta de corrente registada vs. a concentração do padrão adicionado. O teor de ácido lipóico no *Poly-MVA*TM está sujeito a uma receita própria do produtor e não está mencionado no rótulo. O valor total do ácido lipóico encontrado pelo método proposto é 118,6 mg l⁻¹, **Tabela 4.1**.

O conteúdo de três cápsulas de *Solgar-ALA* foi dissolvido em água/álcool etílico 1:1. Para uma melhor solubilidade a solução foi agitada mecanicamente utilizando um agitador. A solução foi filtrada para remover o estearato de magnésio não dissolvido utilizado como antiaglomerante. A solução clara do filtrado foi utilizada para a análise misturando-a com o electrólito de suporte. A análise das amostras foi executada sem desoxigenação. Um volume de 10 μ l foi tomado da solução estoque e diluído 50 vezes no tampão fosfato de pH 7,0. O mesmo procedimento foi aplicado para a avaliação do teor de ácido lipóico nas cápsulas de *Solgar-ALA*, e os resultados estão apresentados na **Tabela 4.1**.

O primeiro voltamograma mostra a presença de um único pico de oxidação, que aumenta nos seguintes varrimentos com a adição de quantidades conhecidas de ácido α -lipóico padrão **Fig. 4.10B**. A diferença no potencial da oxidação entre o ácido α -lipóico padrão e os dois suplementos que contêm o ácido α -lipóico livre é devida a um efeito de matriz.

Tabela 4.1 – Determinação do ácido α -lipóico em amostras reais (n = 5)

Amostra	Valor no rótulo (mg)	Total adicionado (μ mol l ⁻¹)	Encontrado (μ mol l ⁻¹)	Recuperado (%)	Valor total (mg)
<i>Poly-MVA</i> TM	—	20	11.3 \pm 0.49	—	28.03
<i>Solgar-ALA</i>	60	33	13.80 \pm 0.15	98.2	58.97

4.7 Conclusões

O estudo apresentado mostra que o ácido α -lipóico, uma substância com largas aplicações nas actividades biológicas e clínicas, sofre oxidação no eléctrodo de carbono vítreo. O processo de oxidação é independente do pH e ocorre numa única etapa irreversível com a transferência de um electrão, o que conduz à formação do ácido β -lipóico e nenhum produto de oxidação electroactivo foi encontrado.

Um método eletroquímico foi desenvolvido para a determinação do ácido α -lipóico livre em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, com o limite de detecção de 1,8 μ M e o limite de quantificação de 6,1 μ M. Os resultados demonstraram que uma determinação directa do conteúdo de ácido α -lipóico livre em amostras comerciais é possível, utilizando um eléctrodo de carbono vítreo com a voltametria de impulso diferencial, seguindo a oxidação do ácido α -lipóico.

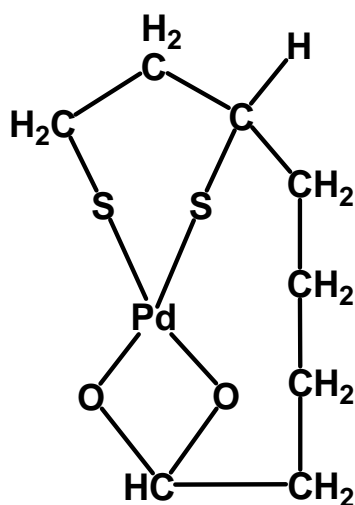
CAPÍTULO 5

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO COMPLEXO PALADÍO – ÁCIDO LIPÓICO E DA INTERACÇÃO COM O ADN

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos para o estudo de um complexo de paládio com o ácido lipóico (Pd-LA – “palladium-lipoic acid”), *per se* e dentro de uma matriz complexa, o xarope *Poly-MVA™*. A estabilidade do complexo foi testada aplicando um alto potencial negativo ou positivo, e os resultados foram seguidos por voltametria. Estudou-se também o mecanismo de interacção do Pd-LA e do *Poly-MVA™* com o ADN em hélice dupla, a investigação sendo direccionada para a detecção electroquímica de possíveis danos oxidativos no ADN.

5.1 Introdução

O complexo de paládio com o ácido lipóico (Pd-LA) consiste num átomo de paládio ligado a uma molécula de ácido lipóico (LA), numa relação de 1:1, como apresentado no **Esquema 5.1**.



Esquema 5.1 – Estrutura proposta do complexo paládio-ácido lipóico.

O ácido lipóico actua como ligando no complexo Pd-LA, para o qual disponibiliza os seus grupos funcionais constituídos pelos dois enxofres do anel tiolano e pelo grupo carboxilo da cadeia pentanoíca. A presença do ácido lipóico na molécula poderia conferir ao complexo uma das suas características mais importantes [201], ou seja, a solubilidade do ácido lipóico em meio aquoso e a habilidade de penetrar a barreira hematoencefálica e a membrana celular. Este arranjo original levou a considerar que o complexo Pd-LA poderia ser utilizado no tratamento de vários cancros [200, 206, 207].

Um biossensor electroquímico com ADN, baseado na modificação superficial de um eléctrodo de carbono vítreo com ADN em dupla hélice (dsDNA), foi utilizado para a detecção da interacção Pd-LA – ADN [222].

5.2 Comportamento redox do complexo Pd-LA e do *Poly-MVA*TM

O comportamento voltamétrico do ácido lipóico, LA, foi previamente estudado e apresentado no *Capítulo 4*. O único pico anódico ocorreu ao potencial $E_{pa} = + 0,80$ V, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, e corresponde a uma oxidação irreversível do ácido α -lipóico ao ácido β -lipóico.

A caracterização voltamétrica do complexo Pd-LA na superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi iniciada com a voltametria cíclica numa solução de 1 mM Pd-LA em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturada com N₂. Na **Fig. 5.1** está apresentado um voltamograma cíclico registado a partir do potencial $E_i = 0,00$ V, e seguindo no sentido positivo entre os limites de potenciais $E_1 = + 1,40$ V e $E_2 = - 1,00$ V. Só depois de uma ciclagem extensiva na solução, o voltamograma cíclico mostrou um pico anódico a $E_{pa} = + 1,20$ V e um pico catódico a $E_{pc} = - 0,40$ V.

Após dez varrimentos de voltametria cíclica, o eléctrodo de carbono vítreo foi removido da solução de 1 mM Pd-LA, lavado com água desionizada e transferido para uma célula electroquímica contendo somente tampão acetato 0,1 M pH 4,5. O voltamograma registado no electrólito de suporte mostrou claramente um comportamento redox mais complexo a este valor de pH, **Fig. 5.2**, que pode ser relacionado com o comportamento electroquímico de nanoestruturas de paládio

electrodepositado no eléctrodo de carbono vitreo, comportamento previamente estudado e apresentado no *Capítulo 3*.

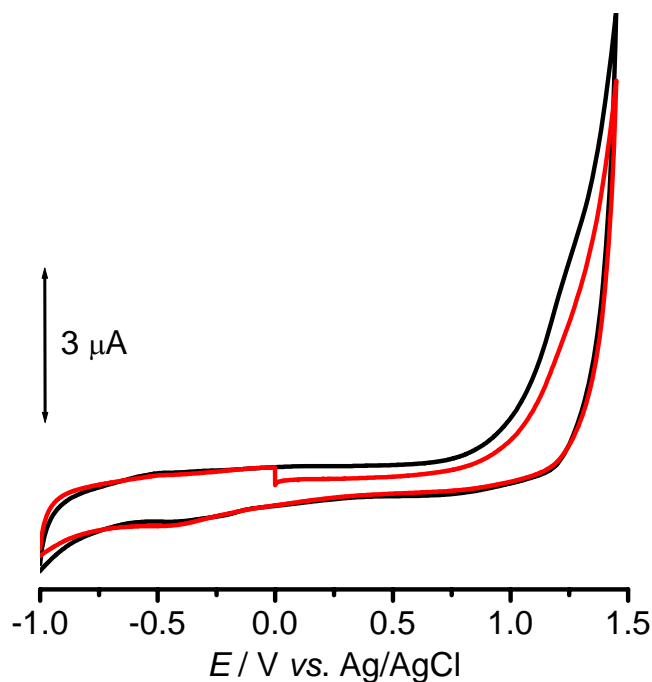


Figura 5.1 – Voltamogramas cíclicos numa solução de 1mM Pd-LA em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1º e (—) 10º varrimento; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

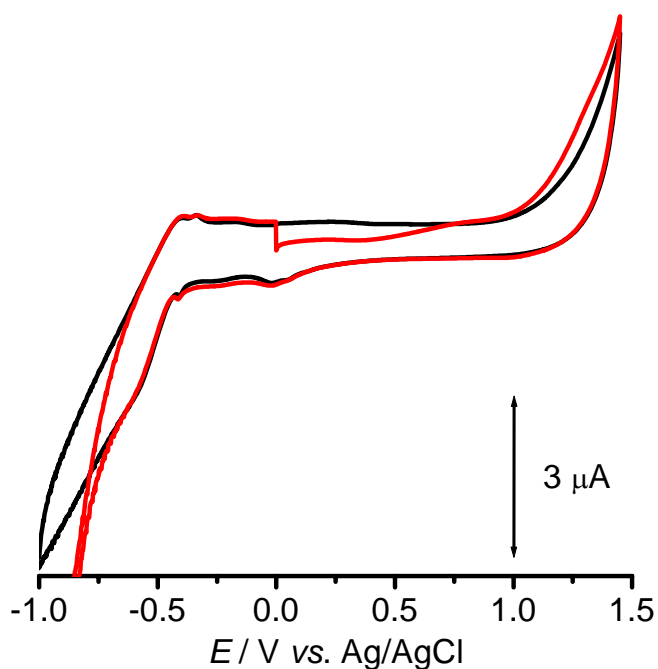


Figura 5.2 – Voltamogramas cíclicos obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após 10 varrimentos numa solução de 1mM Pd-LA: (—) 1º e (—) 3º varrimento; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Em seguida foi analisado o xarope *Poly-MVA™*, um suplemento nutritivo com base num polímero do complexo Pd-LA, ao qual foi adicionado tiamina, de maneira a formar um trímero. O *Poly-MVA™* também contém o ácido lipóico livre, ou seja não ligado ao paládio, como previamente quantificado e mostrado no *Capítulo 4*, e outros componentes como minerais, vitaminas e aminoácidos.

O comportamento voltamétrico do *Poly-MVA™* foi estudado pela voltametria cíclica numa solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA™* (contendo 4 mM do complexo Pd-LA), em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

Os voltamogramas registados mostraram três picos de oxidação no primeiro varrimento, **Fig. 5.3**, que não aumentam com a ciclagem contínua, dez varrimentos, na mesma solução. Quando o eléctrodo foi transferido para uma solução de tampão acetato 0,1 M pH 4,5, o voltamograma mostrou somente um ligeiro aumento da corrente em $\approx +1,20\text{V}$ no primeiro varrimento, **Fig. 5.4**.

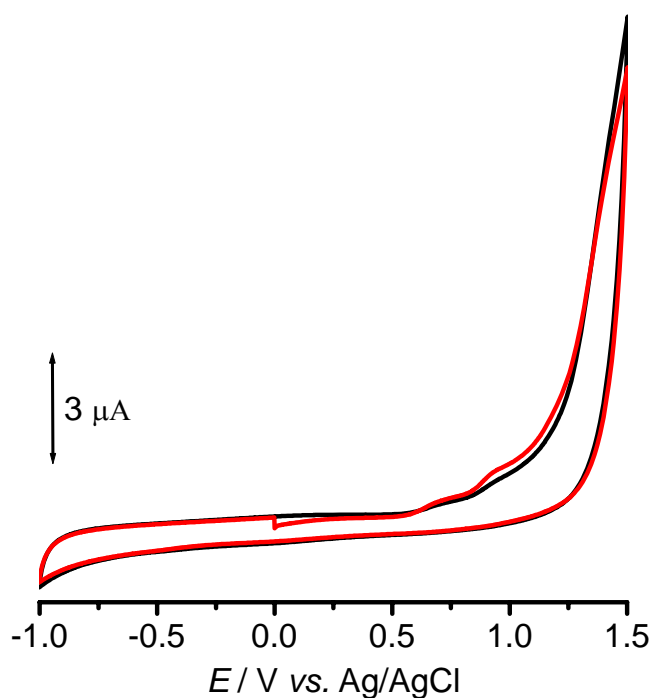


Figura 5.4 – Voltamogramas cíclicas numa solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA™* em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1º e (—) 10º varrimento; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

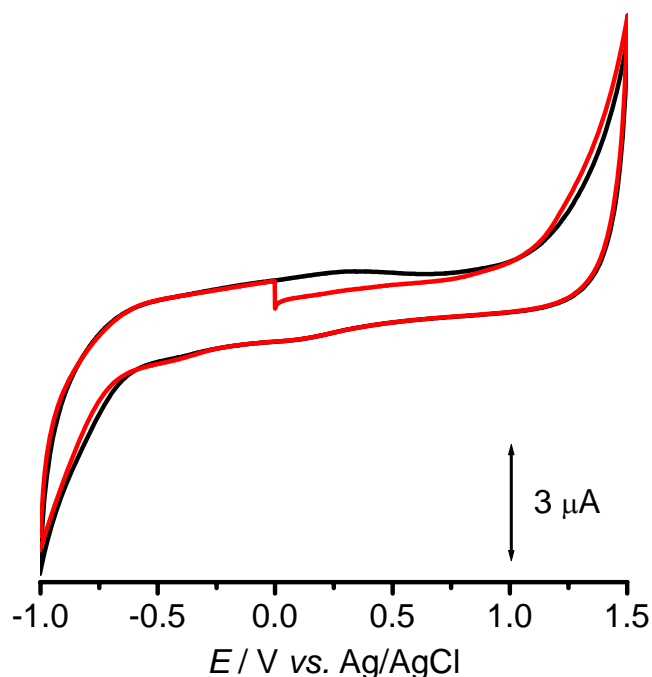


Figura 5.4 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após 10 varrimentos numa solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM.
(—) 1º e (—) 3º varrimento; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Empregando a voltametria de impulso diferencial, **Fig. 5.5**, a partir do potencial $E_i = 0,00 \text{ V}$ ao $E_1 = + 1,40 \text{ V}$, foi possível uma melhor avaliação dos processos de oxidação do *Poly-MVA*TM e uma comparação com os resultados de oxidação do complexo Pd-LA. O voltamograma registado em 1 mM Pd-LA no tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH $7,0$ mostrou um pico de oxidação bem definido ao $E_{pa} = + 1,11 \text{ V}$. No caso da solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM (4 mM Pd-LA) em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH $7,0$, o voltamograma mostrou três picos de oxidação ao $E_{pa} = + 0,57 \text{ V}$, $+ 0,85 \text{ V}$ e $+ 1,30 \text{ V}$, similarmente aos resultados obtidos por voltametria cíclica.

Foi também realizada uma experiência de adsorção espontânea, durante 3 minutos, directamente das soluções padrão de 13 mg mL^{-1} *Poly-MVA*TM (40 mM complexo Pd-LA), de 10 mM Pd-LA , e de 1 mM PdCl_2 . Após a adsorção, o eléctrodo foi lavado e transferido no tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH $4,5$, onde foram registadas voltamogramas de impulso diferencial, **Fig. 5.6**.

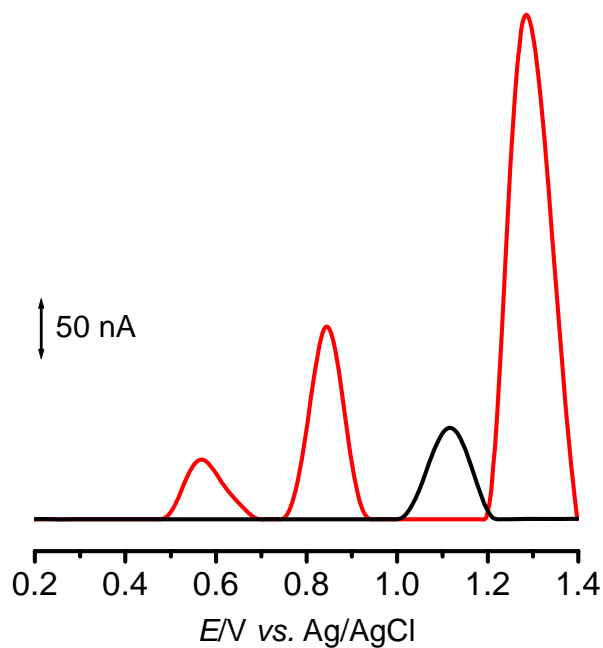


Figura 5.5 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) 1mM Pd-LA e (—) 1,3 mg mL⁻¹ *Poly-MVA™*; em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

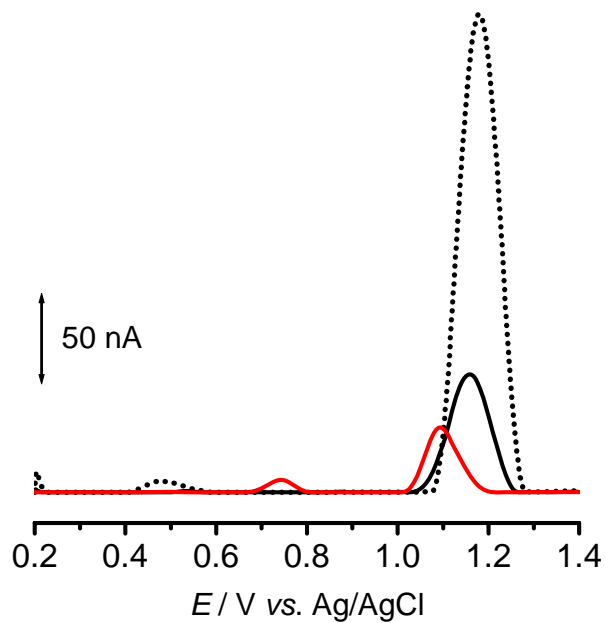


Figura 5.6 – Voltamogramas de impulso diferencial em tampão acetato pH 4,5 após 3 min de adsorção espontânea de: (—) 10 mM Pd-LA, (—) 13 mg mL⁻¹ *Poly-MVA™* e (•••) 1 mM PdCl₂.

Para uma melhor compreensão do processo de adsorção do complexo Pd-LA e do *Poly-MVA™* nas superfícies dos eléctrodos de carbono, a adsorção dos mesmos foi investigada num estudo complementar por AFM [222]. Foi realizada também uma caracterização do processo de adsorção do ácido lipóico, a partir de soluções de várias concentrações, para permitir uma boa comparação com os resultados obtidos no caso do Pd-LA e do *Poly-MVA™*. As imagens de AFM, **Fig. 5.7**, obtidas após a adsorção espontânea do ácido α -lipóico a partir de soluções de 0,4 mM e de 40 mM, mostraram a formação de filmes com morfologias diferentes, dependendo da concentração utilizada. No caso da solução de concentração baixa, **Fig. 5.7A**, foi observado a formação de uma monocamada de moléculas com pequenos agregados uniformemente distribuídos no filme. Para a solução de 40 mM foram observados filmes com estruturas diferentes, um filme multicamada fino e com agregados globulares, **Fig. 5.7B e C**, e um filme multicamada espesso e liso, **Fig. 5.7B e D**.

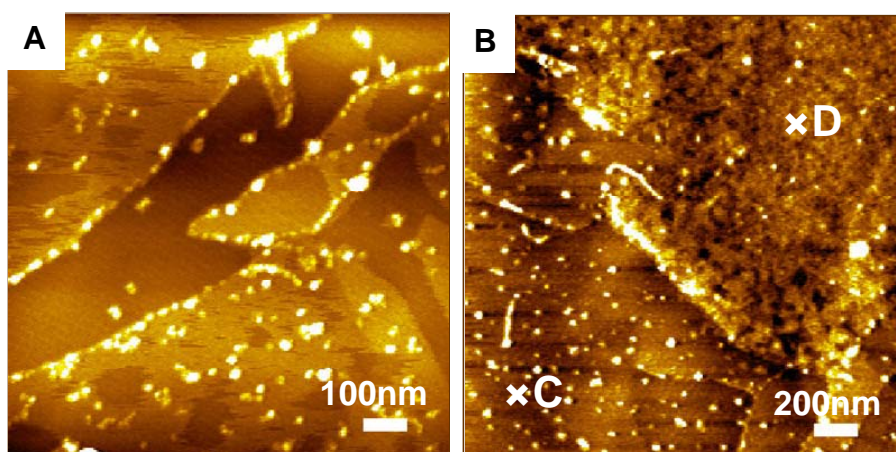


Figura 5.7 – Imagens de AFM [222] após 3 min. de adsorção espontânea a partir de soluções de ácido α -lipóico: **A)** 0,4 mM e **B)** 40 mM.

As imagens de AFM obtidas para o complexo Pd-LA, **Fig. 5.8A**, mostraram uma monocamada com agregados de moléculas empilhadas na superfície do eléctrodo, para uma concentração de 0,1 μ M Pd-LA. Com o aumento da concentração utilizada para a adsorção espontânea, **Fig. 5.8B e C**, foi observada a formação de um filme com filamentos enrolados e com poros. Já para uma concentração de 100 μ M Pd-LA, **Fig. 5.8D**, a superfície do eléctrodo ficou completamente coberta com um filme espesso e uniforme.

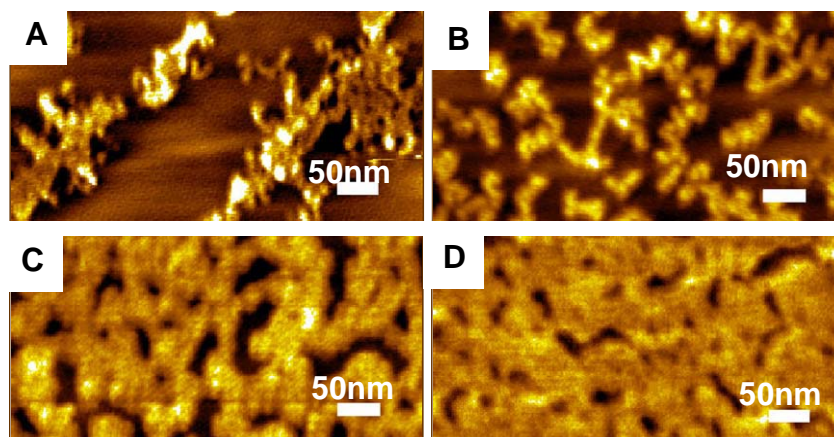


Figura 5.8 – Imagens de AFM [222] após 3 min. de adsorção espontânea a partir de soluções de Pd-LA: **A)** 0,1 μM , **B)** 1 μM , **C)** 10 μM e **D)** 100 μM .

Os resultados de AFM obtidos após a adsorção espontânea do *Poly-MVA*TM são mostrados na **Fig. 5.9**. Para uma concentração de 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM (10 μM Pd-LA) foram observadas apenas algumas moléculas na superfície do eléctrodo, formando pequenos agregados. No caso duma concentração mais elevada, 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM (100 μM Pd-LA), **Fig. 5.9B**, a imagem mostrou a formação de um filme uniforme mas incompleto, com filamentos espessos.

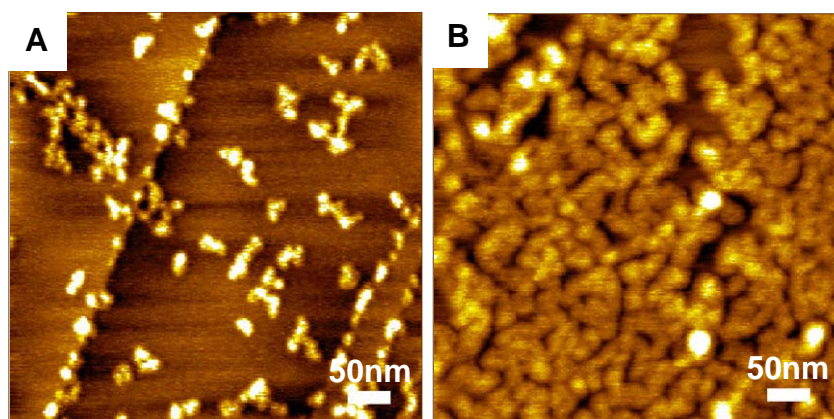


Figura 5.9 – Imagens de AFM [222] após 3 min. de adsorção espontânea a partir de soluções de *Poly-MVA*TM: **A)** 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (10 μM Pd-LA) e **B)** 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100 μM Pd-LA).

A topografia do eléctrodo de HOPG modificado com o complexo Pd-LA evidenciou que o Pd-LA adsorve fortemente na superfície do eléctrodo, mesmo para uma concentração muito baixa de 0,1 mM Pd-LA, **Fig. 5.8A**, quando comparado com as moléculas de ácido α -lipóico que formam apenas uma monocamada incompleta para uma concentração de 400 mM LA, **Fig. 5.9A**.

A maior adsorção do complexo Pd-LA nos eléctrodos de carbono está relacionada com a presença do paládio na estrutura do LA, o que facilita a interacção com o substrato do HOPG. Os resultados anteriores de voltametria e estudos complementares de AFM, apresentados no *Capítulo 3*, mostraram que o paládio apresenta adsorção espontânea em eléctrodos de carbono a partir de soluções de paládio(II).

Voltametria cíclica e voltametria de impulso diferencial para o complexo Pd-LA sugerem o comportamento voltamétrico típico do paládio. As características observadas em solução, nos voltamogramas da **Fig. 5.1**, e após ter transferido o eléctrodo para o electrólito de suporte, **Fig. 5.2**, foram confirmadas com os resultados obtidos após a adsorção espontânea do PdCl₂, **Fig. 5.6**, que mostraram o pico característico do óxido do paládio, $E_{pa} = + 1,15$ V em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, formado durante o varrimento. Os resultados de voltametria e de AFM do complexo Pd-LA, estão de acordo com a estrutura proposta no **Esquema 5.1**, ou seja, a presença do paládio no complexo com o ácido lipóico facilita a interacção do mesmo com as superfícies de carbono.

No caso do *Poly-MVATM*, os resultados mostraram que três processos de oxidação ocorreram quando os voltamogramas foram obtidos após varrimentos em solução, **Fig. 5.3** e **Fig. 5.5**. Após a transferência do eléctrodo para o electrólito de suporte, **Fig. 5.6**, o processo de oxidação registrado a $E_{pa} = + 1,10$ V não foi relacionado com formação dos óxidos de paládio.

No caso do pico anódico ao potencial $E_{pa} = + 0,85$ V, **Fig. 5.5**, foi encontrado o ácido lipóico livre presente no *Poly-MVATM*, como confirmado pela determinação por adição padrão do ácido α -lipoico, no *Capítulo 4*.

No que respeita o processo de oxidação que ocorre ao potencial $E_{pa} = + 0,57 \text{ V}$, **Fig. 5.5**, considera-se que está relacionado a oxidação de um dos outros componentes presentes na matriz complexa do *Poly-MVA*TM.

Sendo que no estudo voltamétrico destes compostos foram observadas características relacionadas com o comportamento electroquímico do paládio, em seguida procedeu-se à aplicação de um potencial positivo ou negativo elevado, de modo a testar a estabilidade dos complexos em relação à electrodeposição do paládio.

5.3 Electrodeposição do complexo Pd-LA e do *Poly-MVA*TM

A electrodeposição no eléctrodo de carbono vítreo do complexo Pd-LA e do *Poly-MVA*TM foi realizada aplicando os potenciais $E_{dep} = - 1,00 \text{ V}$ ou $E_{dep} = + 1,20 \text{ V}$, durante 30 minutos, numa solução de 1 mM Pd-LA ou de 1,3 mg mL⁻¹ *Poly-MVA*TM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Após a electrodeposição, o eléctrodo de carbono vítreo foi lavado com água e transferido para uma célula electroquímica contendo somente o tampão acetato 0,1 M pH 4,5.

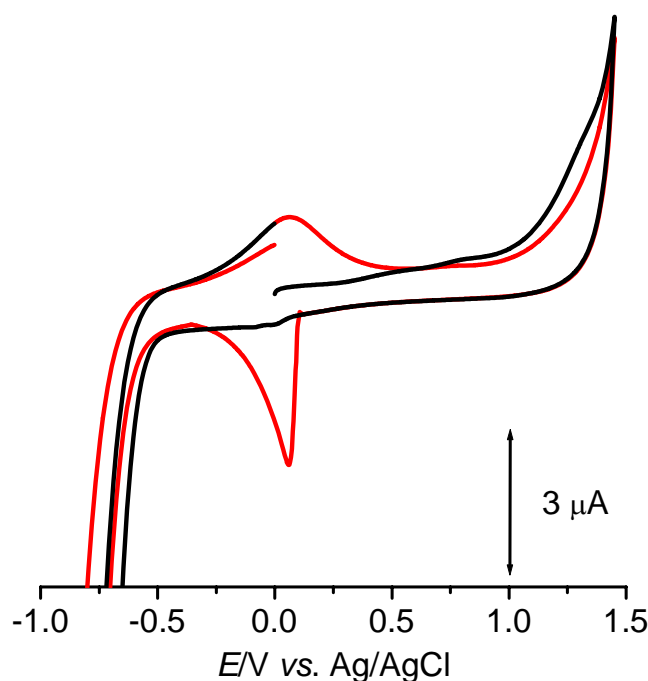


Figura 5.10 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de $- 1,00\text{V}$ numa solução de 1 mM Pd-LA:

(—) 1º e (—) 2º varrimento; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

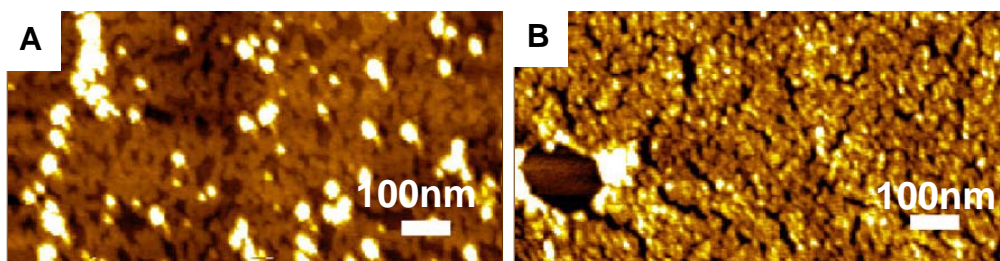


Figura 5.11 – Imagens de AFM [222] a partir duma solução de 100 μM Pd-LA após a aplicação do potencial de: **A)** $-1,00\text{V}$ e **B)** $+1,20\text{V}$.

Após a electrodeposição ao potencial $E_{\text{dep}} = -1,00\text{ V}$ na solução de 1 mM Pd-LA, nos voltamogramas registados foi observado um comportamento redox muito complexo, com várias reacções de transferência de carga que ocorrem para potenciais positivos e negativos, **Fig. 5.10**. A forma da onda voltamétrica modifica-se com a ciclagem, nos varrimentos subsequentes ocorrendo um pico anódico ao $E_{\text{pa}} = +0,06\text{ V}$ e, após ter invertido o sentido do varrimento, foi encontrado também um pico catódico a $E_{\text{pc}} = +0,05\text{ V}$. As imagens de AFM, **Fig. 5.11A**, mostraram pequenas nanopartículas de forma irregular, de aproximadamente 3 – 7 nm de altura, dispersas aleatoriamente numa rede complexa, ao longo dos terraços do HOPG.

Após a electrodeposição ao potencial de $E_{\text{dep}} = +1,20\text{ V}$ na solução de 1 mM Pd-LA, os voltamogramas obtidos no electrólito de suporte pH 4.5 mostraram somente pequenos picos de redução, ao $E_{\text{pc}} = +0,06\text{ V}$ e $E_{\text{pc}} = -0,30\text{ V}$, **Fig. 5.12**, enquanto que nas imagens de AFM, **Fig. 5.11B**, foi observado um filme muito compacto e com pequenos agregados globulares.

Os estudos de voltametria apresentados e discutidos no *Capítulo 3*, mostraram que o paládio pode ser electrodepositado nas superfícies de carbono como paládio(0), após ser aplicado um potencial negativo, ou como óxidos do paládio, após ser aplicado um potencial positivo. Ao aplicar o potencial de $E_{\text{dep}} = -1,00\text{ V}$ foi verificado que mais paládio poderia ser removido do complexo Pd-LA e ser depositado no eléctrodo de carbono vítreo como Pd(0), do que no caso da ciclagem contínua, **Fig. 5.1**. Os voltamogramas mostram o comportamento característico do paládio electrodepositado, ou seja, a formação dos óxidos nos potenciais positivos com a redução subsequente, a incorporação do hidrogénio molecular nos potenciais negativos e a oxidação do mesmo, **Fig. 5.10**.

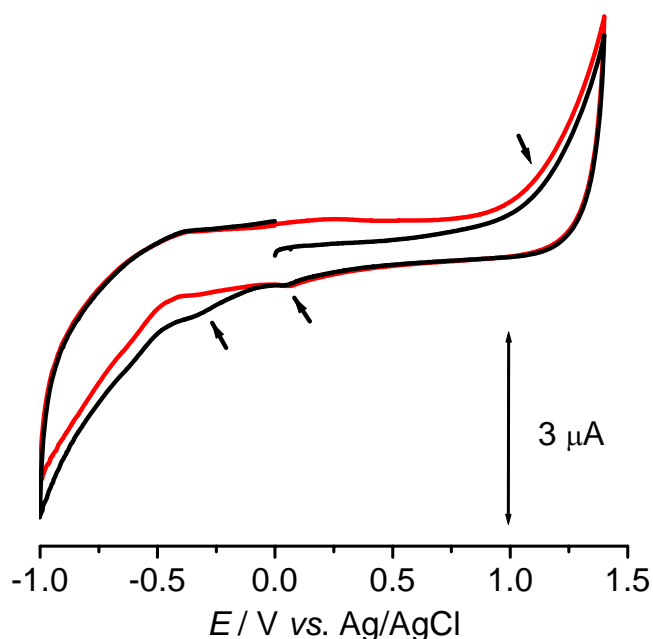


Figura 5.12 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de + 1,20 V numa solução de 1 mM Pd-LA:

(—) 1º e (—) 3º varrimento; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os estudos de AFM [159, 163] também demonstraram que nestas condições foram obtidas nanopartículas e nanofios de Pd(0) electrodepositado na superfície do HOPG. Portanto, a aplicação de um potencial negativo elevado causou a dissociação do complexo Pd-LA e a deposição do Pd(0) como nanopartículas, que foram incorporadas no filme formado por uma mistura de moléculas de LA e de Pd-LA, **Fig. 5.11A**.

A electrodeposição ao $E_{\text{dep}} = + 1,20 \text{ V}$ foi igualmente executada a fim de confirmar que o paládio poderia ser removido do complexo Pd-LA e depositado directamente como óxido de paládio. Os picos obtidos somente no electrólito de suporte, embora menores do que no caso da electrodeposição para $E_{\text{dep}} = - 1,00 \text{ V}$, mostraram a redução dos óxidos do paládio depositados no eléctrodo de carbono vítreo ao Pd(0), **Fig. 5.12**.

Nas imagens de AFM [222], **Fig. 5.11A**, verificou-se que a aplicação de um potencial positivo induziu a oxidação do complexo Pd-LA e a formação de multicamadas compostas por óxidos de paládio, LA e Pd-LA.

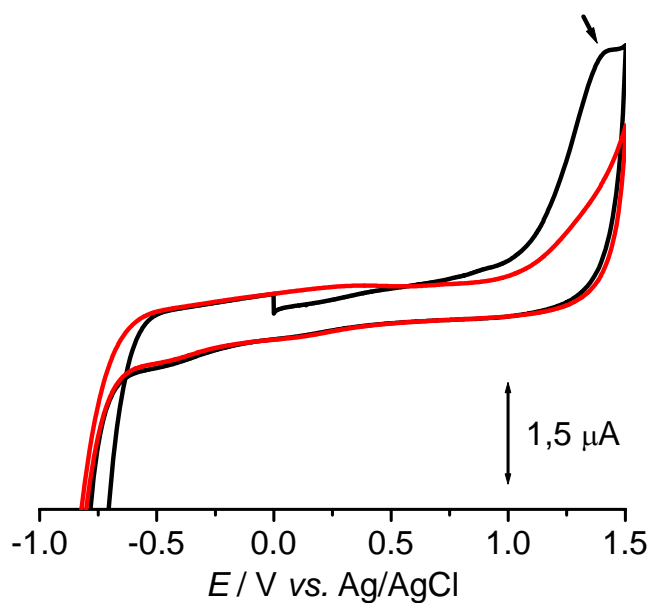


Figura 5.13 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de -1,00 V numa solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM.
(—) 1º e (—) 3º varrimento; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

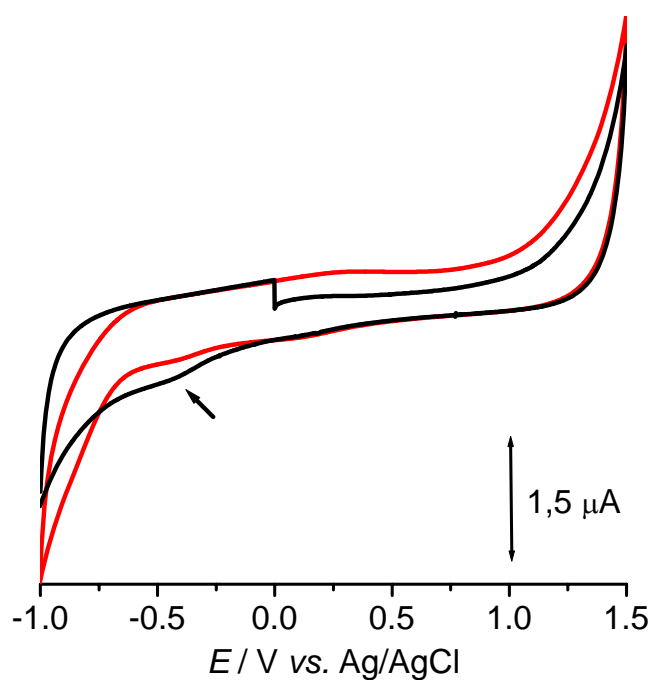


Figura 5.14 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de +1,20 V numa solução de $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM.
(—) 1º e (—) 3º varrimento; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Em relação à electrodeposição do *Poly-MVATM*, os voltamogramas obtidos a partir duma solução de 1,3 mg mL⁻¹, após a electrodeposição ao $E_{\text{dep}} = - 1,0$ V mostraram um pico da oxidação no electrólito de suporte a $E_{\text{pa}} = + 1.37$ V, **Fig. 5.13**.

Após a electrodeposição a $E_{\text{dep}} = + 1,20$ V, **Fig. 5.14**, somente um pequeno pico de redução foi observado, $E_{\text{pc}} = - 0,37$ V. Os resultados indicam que o comportamento voltamétrico observado não pode estar associado com a electroquímica conhecida do paládio, **Fig. 5.10** e **Fig. 5.12**, tanto na solução como também após electrodeposição. Neste caso, a deposição de paládio não foi conseguida possivelmente devido ao paládio estar mais protegido na estrutura polimérica com a tiamina no *Poly-MVATM*, do que no complexo Pd-LA.

5.4 A interacção do complexo Pd-LA e do *Poly-MVATM* com o ADN

O mecanismo de interacção do complexo Pd-LA e do *Poly-MVATM* com dsDNA foi caracterizado por voltametria de impulso diferencial a fim de investigar a acção do complexo de paládio na possível desnaturação do ADN e na indução de danos oxidativos.

A superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi modificada com um filme de 50 µg mL⁻¹ dsDNA, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*. Em seguida, o eléctrodo assim modificado foi incubado durante 3, 5 e 10 minutos com soluções de 1 mM complexo Pd-LA ou com 1,3 mg mL⁻¹ *Poly-MVATM* (4 mM Pd-LA) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

Após a incubação, o excesso de solução foi cuidadosamente retirado com água desionizada de modo a garantir a remoção das moléculas não intercaladas no filme de dsDNA, antes da transferência do eléctrodo para o electrólito de suporte. Dessa forma, assegurou-se que os sinais voltamétricos são devidos apenas aos complexos ADN – Pd-LA, ou ADN – *Poly-MVATM*, formados durante a incubação, sem qualquer contribuição difusiva a partir da solução.

Os voltamogramas do GCE modificado foram obtidos em tampão acetato 0,1 M pH 4,5, acompanhando as modificações nos picos de oxidação da dGuo e dAdo e

monitorizando a ocorrência dos biomarcadores de dano oxidativo, 8-oxoguanina e/ou 2,8- dihidroxiadenina.

Ao comparar com os resultados obtidos para o dsDNA de controle, **Fig. 5.15**, os voltamogramas de impulso diferencial registrados em electrólito de suporte pH 4,5 revelaram alterações nas correntes dos picos de oxidação do ADN incubado com 1 mM Pd-LA. Os resultados mostraram uma diminuição apreciável nas correntes da dGuo e da dAdo, mas também a ocorrência do pico de oxidação correspondente a formação de óxidos de paládio, $E_{pa} = + 1,18$ V, que aumentou com o aumento do tempo de incubação. Além disso, após a diminuição inicial dos picos de oxidação do ADN, as correntes voltaram a aumentar, principalmente no caso dos resíduos de adenina. No entanto, não foi constatado qualquer dano oxidativo no ADN, sendo que não foram detectados picos relacionados com a oxidação da 8-oxoGua ou da 2,8-DHA.

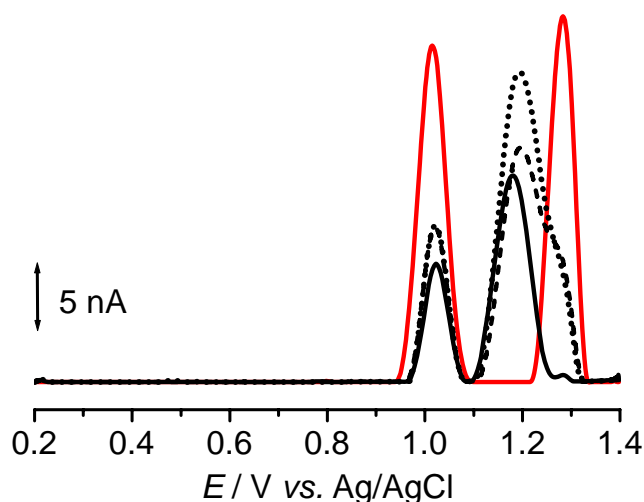


Figura 5.15 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) dsDNA de controle, e complexo de ADN – Pd-LA após (—) 3, (---) 5 e (•••) 10 min. de incubação com 1 mM Pd-LA.

No estudo complementar de AFM, na superfície do HOPG modificada com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA foi adicionada uma solução de $5 \mu\text{M}$ Pd-LA. Após 3 minutos de incubação, o excesso de solução foi removido com água desionizada. As imagens obtidas nestas condições mostraram agregados pequenos de moléculas imobilizadas na superfície do eléctrodo e filamentos enrolados com porções de ADN linear, **Fig. 5.16B**, com uma morfologia diferente das moléculas de dsDNA de controle, **Fig. 5.16A**.

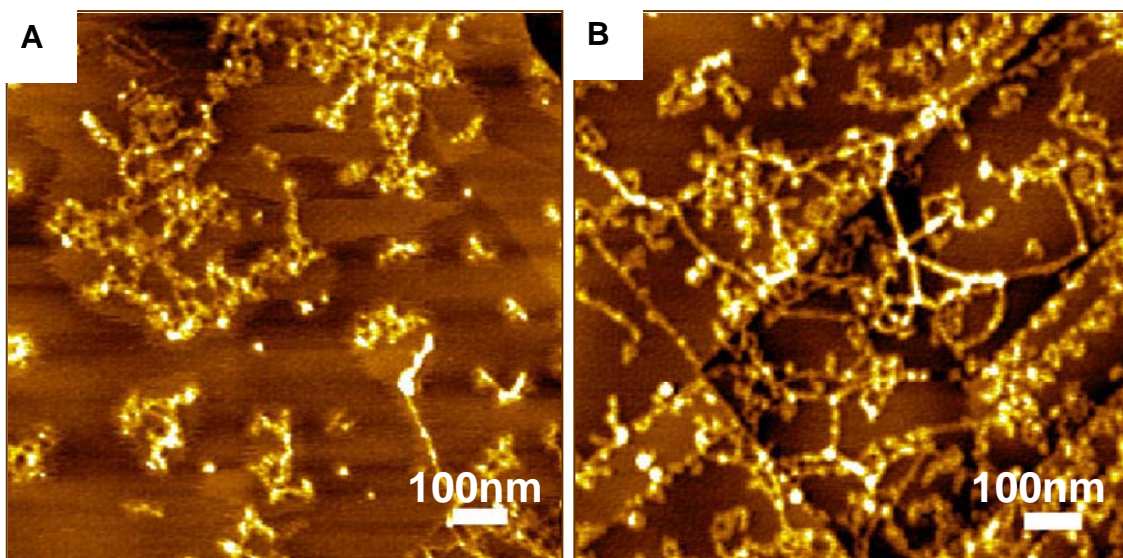


Figura 5.16 – Imagens de AFM [222] de: **A)** $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA de controle, e com **B)** $5 \mu\text{M}$ Pd-LA.

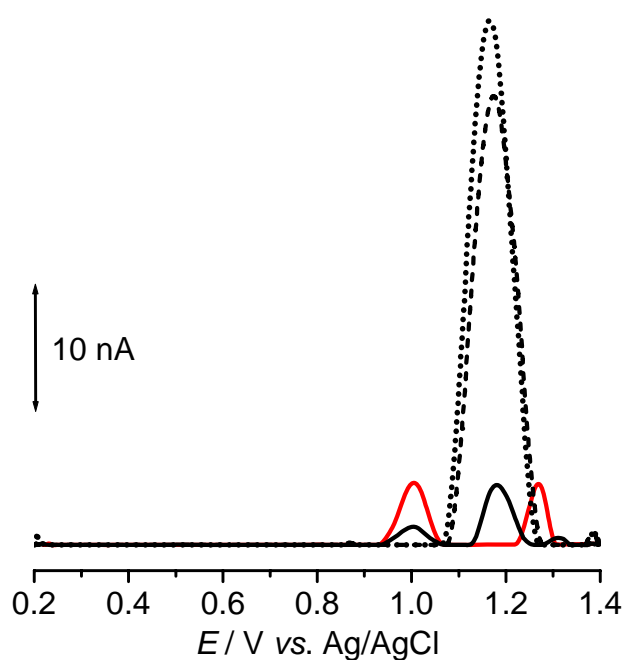


Figura 5.17 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) dsDNA de controle, e complexo de Pd-LA –ADN após 48 h de incubação com com 1 mM Pd-LA: (—) 1º, (---) 2º e (•••) 3º varrimento.

Numa outra experiência, a interacção do complexo Pd-LA com o dsDNA foi avaliada após 48 h de incubação, de maneira a investigar a possível indução de dano oxidativo após longos tempos de incubação. Para o efeito, foi preparada uma solução de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e incubada com 1 mM Pd-LA em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Após a incubação, o GCE foi modificado pela aplicação sequencial de três gotas de $5 \mu\text{L}$ cada, e a superfície do eléctrodo foi seca sob atmosfera de N_2 .

Os voltamogramas de impulso diferencial registados em tampão acetato pH 4,5, **Fig. 5.17**, mostraram correntes de oxidação da dGuo e dAdo muito pequenos, em comparação com o filme de dsDNA de controle preparado pelo mesmo procedimento. Foi também observado um grande pico de oxidação, ao mesmo potencial de + 1,18 V, que aumenta consideravelmente nos varrimentos seguidos, correspondente à co-deposição de óxidos de paládio, o que dificulta a interpretação dos processos de oxidação do ADN nestas condições. Apesar disso, não foram detectados picos relacionados com o dano oxidativo no ADN.

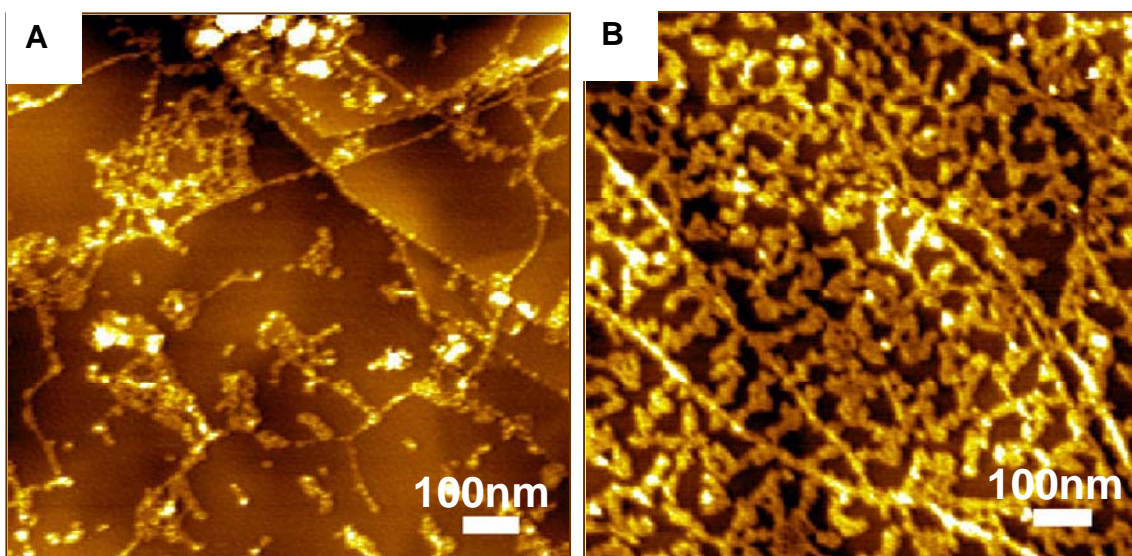


Figura 5.18 – Imagens de AFM [222] de ADN – Pd-LA após 24 h de incubação com:
A) $0,1 \mu\text{M}$ Pd-LA, e B) $5 \mu\text{M}$ Pd-LA.

Nas imagens de AFM, **Fig. 5.18**, obtidas após 24 h de incubação de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com $0,1 \mu\text{M}$ ou $5 \mu\text{M}$ Pd-LA, foram observados pequenos agregados e um elevado número de moléculas de ADN alongadas, a partir de solução com menor

concentração, **Fig. 5.18A**. Na solução de Pd-LA mais concentrada, **Fig. 5.18B**, foi observada a formação de uma rede de filamentos grossos e moléculas de ADN estendidas ao longo dos defeitos do eléctrodo.

Os resultados de voltametria obtidos neste estudo levaram à conclusão que, após a interacção com o complexo Pd-LA, ocorre uma modificação da estrutura do dsDNA, reconhecida através da diminuição dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, **Fig. 5.15** e **Fig. 5.17**. Em seguida a esta diminuição inicial, os picos de oxidação dos resíduos de guanina e de adenina voltaram a aumentar, embora ligeiramente, sugerindo que após a ligação do complexo de Pd-LA, a dupla hélice de ADN abre um pouco de maneira a deixar as bases mais expostas para sofrer oxidação no GCE.

As imagens de AFM, **Fig. 5.16** e **Fig. 5.18**, confirmaram a interacção através das estruturas observadas, com moléculas de ADN mais estendidas na superfície do eléctrodo, quando comparado com o dsDNA de controle. No entanto, a morfologia das estruturas observadas não corresponde a uma desnaturação completa do ADN, como previamente apresentado e discutido no *Capítulo 3*. Apesar de se observar esta interacção, não foram detectados picos de oxidação correspondentes aos danos oxidativos causados ao ADN, quer após tempos curtos de incubação, de até 10 minutos, ou tempos longos de 48 horas.

No caso do filme de dsDNA incubado com $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM (4 mM Pd-LA), nos voltamogramas registados em electrólito de suporte pH 4,5, **Fig. 5.19**, foi observada uma diminuição menor nas correntes de oxidação da dGua e dAdo em relação aos picos do dsDNA de controle.

Contudo, outros processos de oxidação foram detectados, $E_{pa} = + 0,55 \text{ V}$, $E_{pa} = + 0,80 \text{ V}$ e $E_{pa} = + 1,27 \text{ V}$, relacionados com a oxidação dos outros componentes do *Poly-MVA*TM, **Fig. 5.6**, como previamente apresentado na *Secção 5.2*. A presença destes processos de oxidação tornou difícil a avaliação da interacção com o dsDNA, particularmente o pico registado ao potencial de + 1,27 V, devido à sobreposição com o pico de oxidação dos resíduos de adenina.

Todavia, também neste caso foi observado um aumento no pico de oxidação da dGua, após a diminuição inicial, e verificou-se a ausência de picos correspondentes a dano oxidativo causado ao ADN.

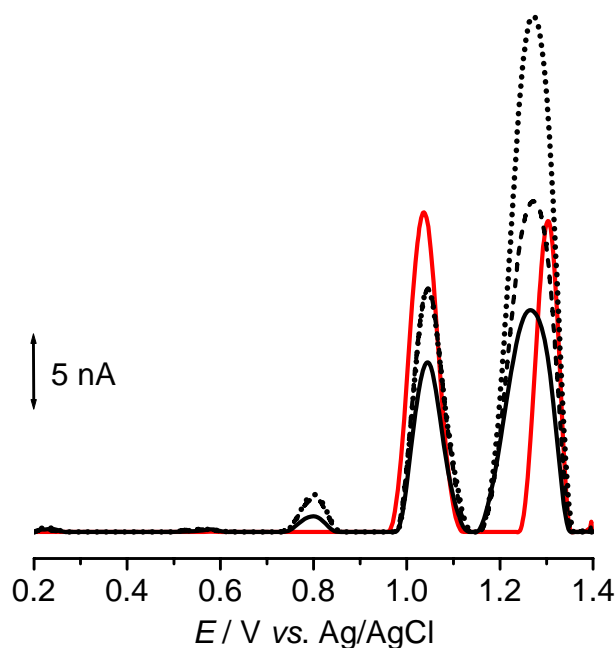


Figura 5.19 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) dsDNA de controle, e complexo de ADN – *Poly-MVA*TM após (—) 3, (---) 5 e (•••) 10 min. de incubação com 1 mM Pd-LA.

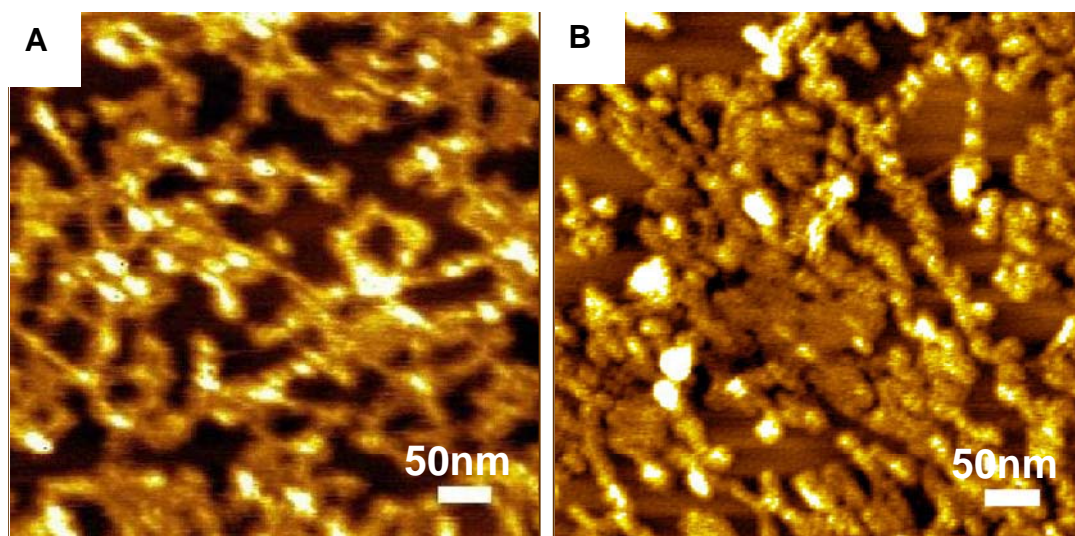


Figura 5.20 – Imagens de AFM [222] de: A) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA de controle, e B) ADN – *Poly-MVA*TM após 24 h de incubação com $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ *Poly-MVA*TM ($10 \mu\text{M}$ Pd-LA).

As imagens de AFM para a interacção entre o dsDNA e o *Poly-MVA*TM, **Fig. 5.20**, mostraram a formação de uma camada não uniforme, com áreas do eléctrodo não cobertas e agregados de moléculas de 1,8 nm de altura, maior que a altura do dsDNA, o que sugere uma interacção complexa do dsDNA com as várias moléculas existentes na solução.

5.5 Conclusões

Os resultados voltamétricos apresentados demonstraram a interação do dsDNA tanto com o complexo Pd-LA, como também com o *Poly-MVATM*, mas sem causar danos oxidativos no ADN. As imagens de AFM revelaram diferentes padrões de adsorção e grau de cobertura superficial, correlacionados com a estrutura, a concentração da solução, o potencial aplicado, bem como o comportamento voltamétrico do LA, Pd-LA e *Poly-MVATM*.

A estabilidade do complexo Pd-LA foi testada pela aplicação de elevados potenciais positivos ou negativos. A aplicação de um potencial negativo causou a dissociação do complexo Pd-LA e a deposição de nanopartículas de Pd(0), enquanto que a aplicação de um potencial positivo levou à oxidação do complexo Pd-LA e à formação de uma camada mista de ácido lipóico e de óxidos de paládio. Ficou demonstrado assim que no caso do complexo Pd-LA a remoção do paládio ainda é possível, enquanto que a partir da solução de *Poly-MVATM* o mesmo não foi conseguido, devido ao paládio estar melhor sequestrado dentro do polímero de Pd-LA ligado a tiamina.

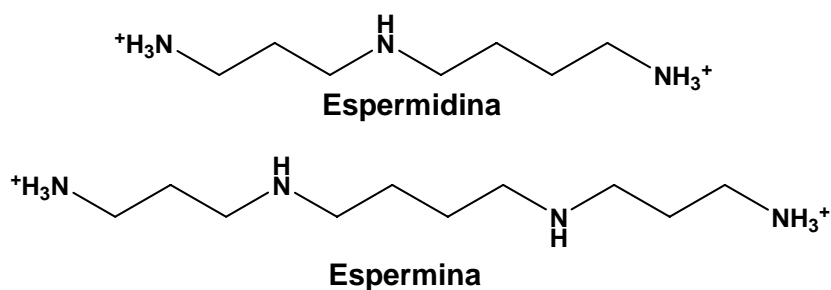
CAPÍTULO 6

**ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA
ESPERMIDINA E ESPERMINA.
A INTERACÇÃO COM O ADN**

Neste capítulo descreve-se uma caracterização voltamétrica das poliaminas biogénicas espermidina e espermina, realizada por voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, estudando-se a influência do pH nos processos de transferência de carga envolvidos na sua oxidação. São também apresentados os resultados obtidos para o estudo de detecção electroquímica da interacção entre a espermidina e a espermina e o ADN de dupla hélice.

6.1 Introdução

As poliaminas biogénicas espermidina e espermina são bases orgânicas com três e quatro átomos de azoto respectivamente, separados por várias unidades de metileno [284]. No **Esquema 6.1** são mostradas as estruturas destas poliaminas como di-catiões, mas existem vários tautómeros devido as posições múltiplas para protonação [15].



Esquema 6.1 – Poliaminas alifáticas protonadas.

Estes compostos estão presentes em quase todas as células de mamíferos e estão envolvidos na diferenciação e proliferação das células normais e malignas. Devido à sua natureza catiónica, as poliaminas influenciam a conformação das macromoléculas biológicas através de interações electrostáticas com sítios aniónicos específicos, tais como os grupos fosfato carregados negativamente do ADN [286, 288].

O estudo voltamétrico de oxidação directa das poliaminas biogénicas espermidina e espermina foi efectuado no eléctrodo de carbono vítreo sem o uso de mediadores, num largo intervalo de pH. A técnica de impulso diferencial foi também utilizada para seguir a interacção destas poliaminas com o ADN, em incubações de curta e longa duração.

6.2 Voltametria cíclica

O comportamento voltamétrico das poliaminas biogénicas espermidina e espermina foi estudado inicialmente em soluções de 100 μM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturadas com N_2 .

Na **Fig. 6.1** estão apresentados os varrimentos sucessivos obtidos na solução de espermidina, **Fig. 6.1A**, e de espermina, **Fig. 6.1B**, iniciados em $E_i = 0,00 \text{ V}$ e registados no intervalo de potencial de $-1,00 \text{ V}$ a $+1,40 \text{ V}$, com uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos mostraram um único pico de oxidação a altos potenciais positivos, irreversível, bem definido no caso da espermina, mas pouco visível para espermidina.

Quando os varrimentos foram registados no intervalo de potencial de $0,00 \text{ V}$ a $+1,40 \text{ V}$, **Fig. 6.2**, foi claramente observado o processo de oxidação da espermidina, $E_{\text{pa}} = +1,15 \text{ V}$, e da espermina, $E_{\text{pa}} = +1,06 \text{ V}$. Os voltamogramas mostraram ainda uma diminuição das correntes com o número de varrimentos registados, seguida de uma estabilização das correntes do pico, e a ausência de picos relacionados com a formação de produtos de oxidação electroactivos.

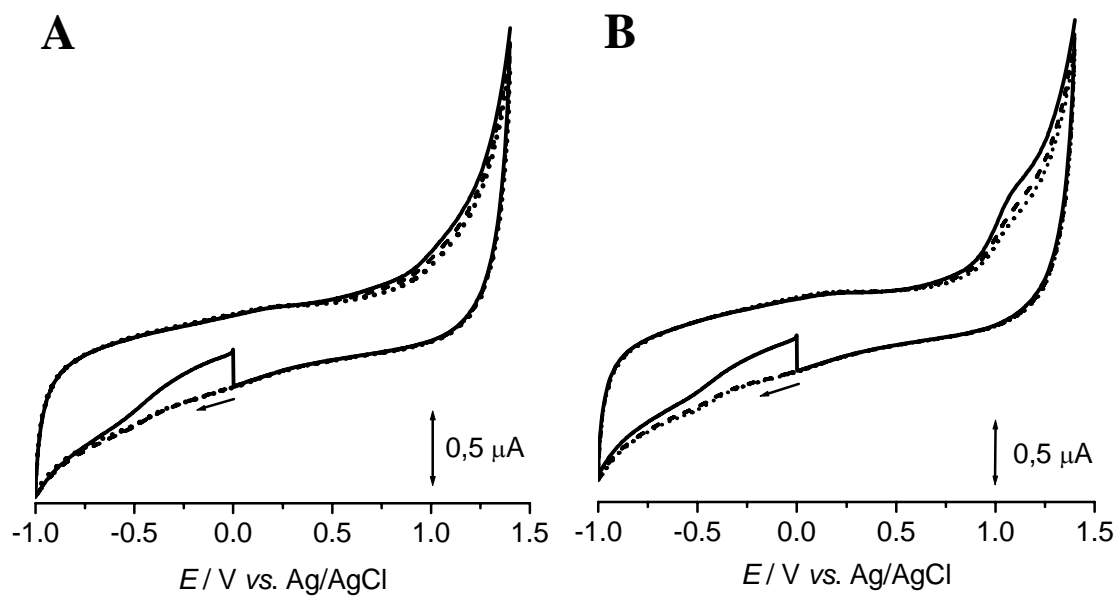


Figura 6.1 – Voltamogramas cíclicos sucessivos numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

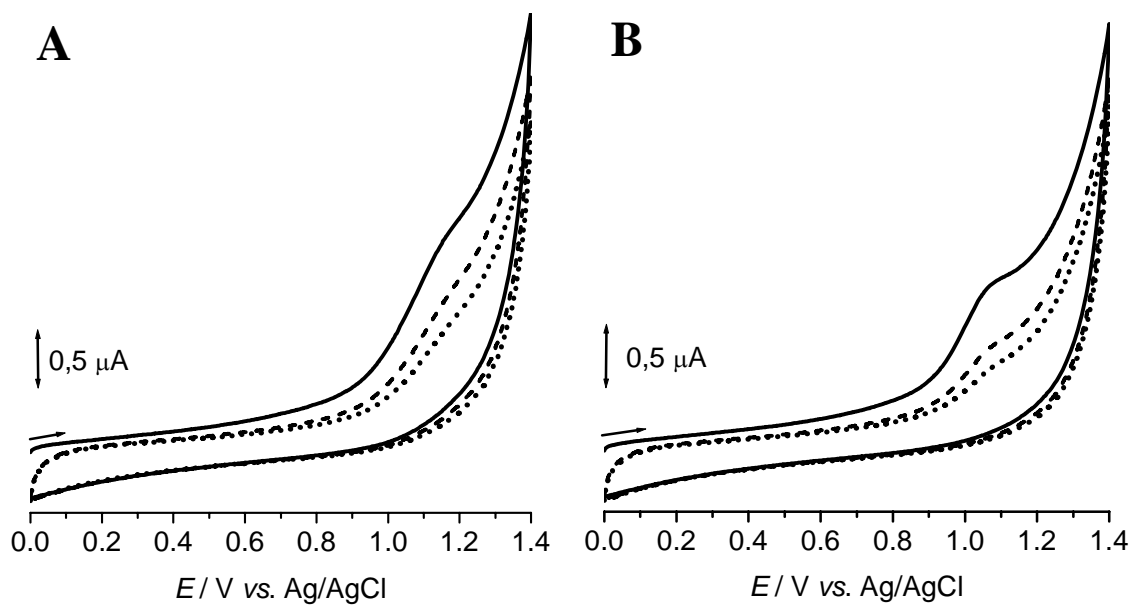


Figura 6.2 – Voltamogramas cíclicos sucessivos numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

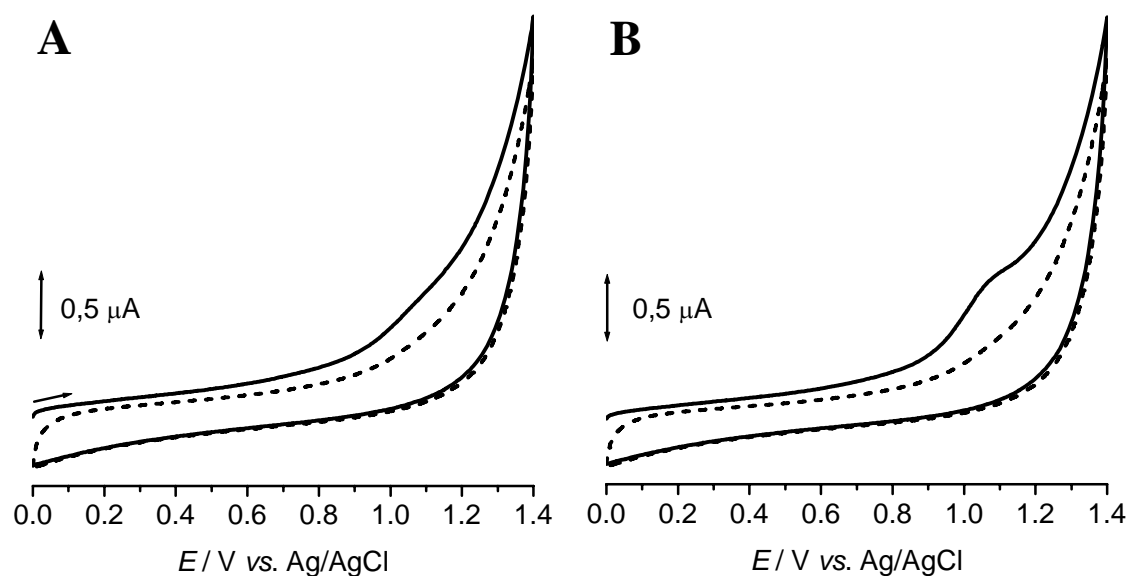


Figura 6.3 – Voltamogramas cíclicos sucessivos no electrólito de suporte pH 7,0 após cinco varrimentos numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina.

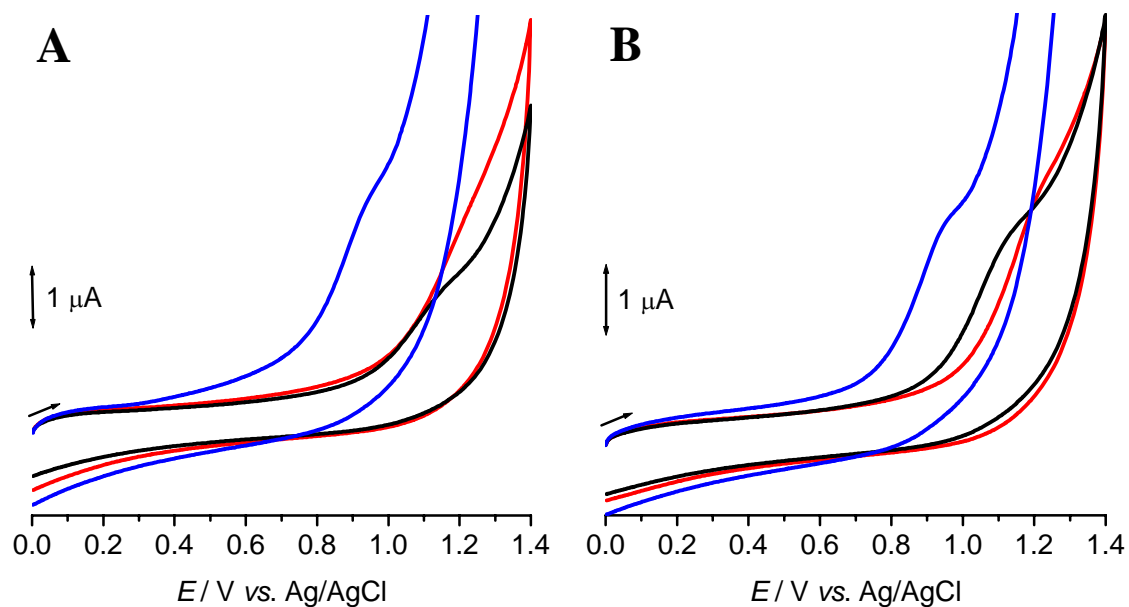


Figura 6.4 – Voltamogramas cíclicas numa solução de 100 μM de **A)** espermidina e **B)** espermina, em diferentes electrólitos de suporte: (—) pH 6,0, (—) pH 7,0 e (—) pH 8,5.

Após cinco varrimentos em solução, o eléctrodo de carbono vítreo foi lavado e transferido para o electrólito de suporte pH 7,0, onde foram registados voltamogramas cíclicos no mesmo intervalo de potencial. Os resultados obtidos, **Fig. 6.3**, mostraram a presença da espermidina e da espermina adsorvidas na superfície do eléctrodo apenas no primeiro varrimento, o que indica uma adsorção fraca destas poliaminas no substrato de carbono vítreo.

Numa outra experiência foi estudada a influência do pH no potencial do pico de oxidação, **Fig. 6.4**, em diferentes electrólitos de suporte com força iónica igual a 0,1 M. Os resultados mostram correntes de pico ligeiramente maiores em meio alcalino e diminuindo em meio neutro e ácido. A largura do pico aumentou em meio ácido, enquanto que o potencial de oxidação diminuiu com o aumento do valor de pH. Os voltamogramas mostraram também correntes de pico menores para a espermidina do que obtido no caso da espermina para a mesma concentração de 100 μM .

6.3 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada, **Fig. 6.5**, mostraram resultados semelhantes aos de voltametria cíclica, ou seja, a presença de um único pico de oxidação, irreversível, tanto para espermidina como para a espermina.

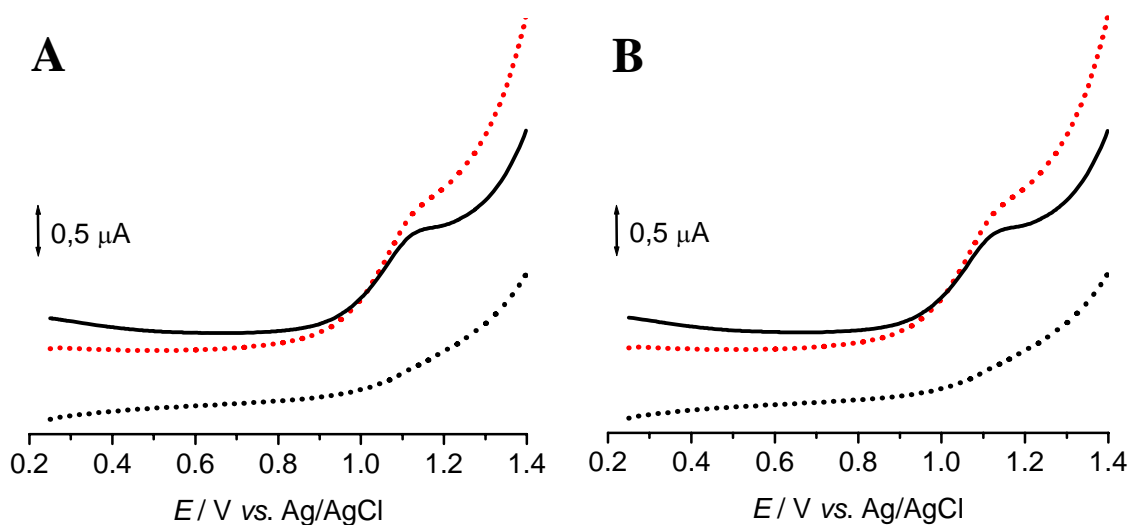


Figura 6.5 – Voltamogramas de onda quadrada numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0.

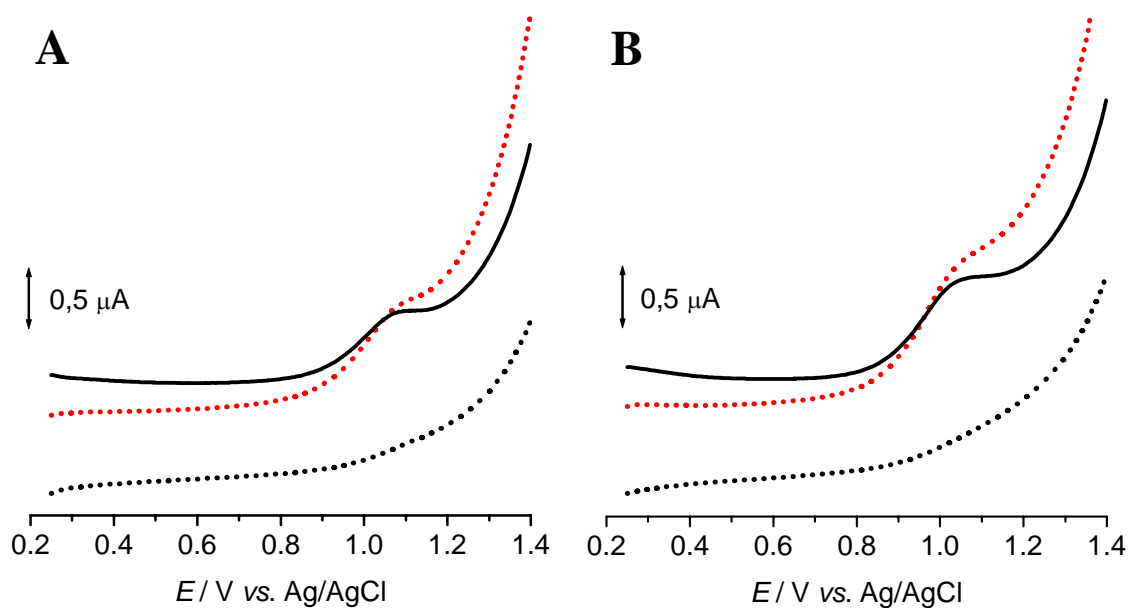


Figura 6.6 – Voltamogramas de onda quadrada numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

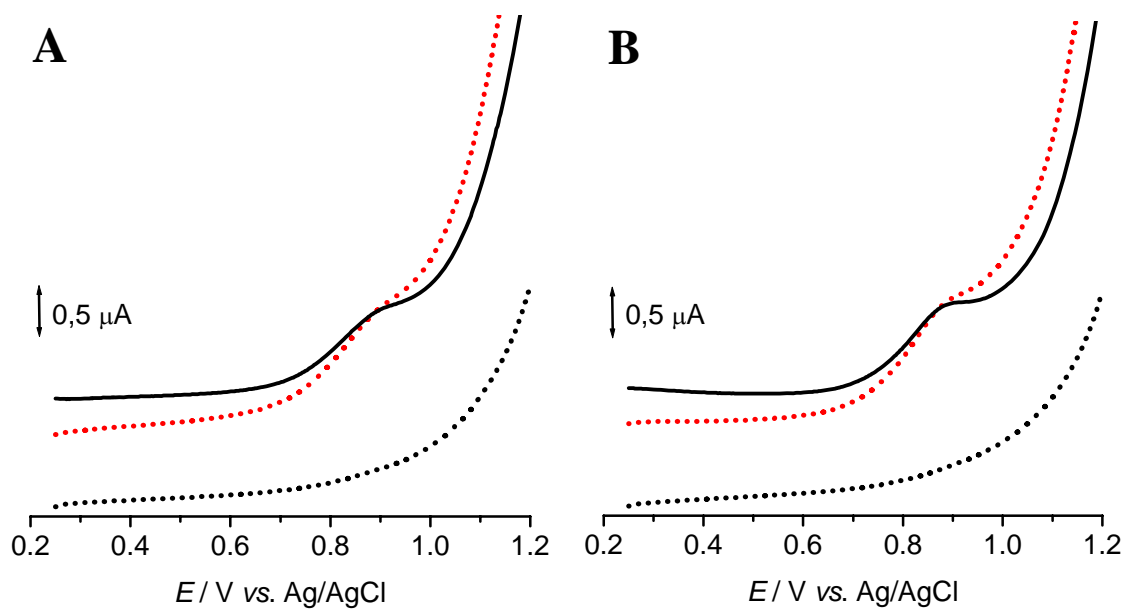


Figura 6.7 – Voltamogramas de onda quadrada numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina em tampão amónia 0,1 M pH 8,5.

Os voltamogramas foram registados com uma frequência de 8 Hz, o que corresponde a uma velocidade efectiva de varrimento de 15 mV s^{-1} . Nestas condições os voltamogramas de onda quadrada apresentaram o pico de oxidação das poliaminas bem definido em meio ácido, **Fig. 6.5**, neutro, **Fig. 6.6**, ou alcalino, **Fig. 6.7**, quando comparado com os resultados de voltametria cíclica registados com uma velocidade de varrimento de 100 mV s^{-1} , o que sugere uma cinética lenta do processo de oxidação.

6.4 Voltametria de impulso diferencial e estudo de pH

O estudo por voltametria de impulso diferencial da espermidina e da espermina foi efectuado num intervalo de pH de 5,1 a 11,1. Foi observado o mesmo processo de oxidação, e foi também verificada uma dependência do potencial de oxidação com o pH. Na **Fig. 6.8** estão apresentados varrimentos sucessivos obtidos numa solução de $100 \mu\text{M}$ de espermidina, **Fig. 6.8A**, e de espermina, **Fig. 6.8B**, registados com uma velocidade de varrimento de 5 mV s^{-1} . Também pela voltametria de impulso diferencial foram observados correntes de pico baixas para a espermidina, em relação às correntes obtidas para a mesma concentração de espermina, e uma variação no potencial de oxidação.

Com o objectivo de esclarecer este comportamento, foi efectuada uma experiência de adsorção espontânea durante 10 minutos numa solução preparada de novo, com a mesma concentração de $100 \mu\text{M}$, e os resultados foram comparados com o último varrimento registado em solução, **Fig. 6.9**. Os resultados apresentados mostram que após a adsorção espontânea, a espermidina e a espermina sofrem oxidação ao mesmo potencial, $E_{\text{pa}} = + 0,93 \text{ V}$, o mesmo que foi obtido para a oxidação em solução de espermina, **Fig. 6.9B**, mas as correntes registadas para espermidina continuaram a ser menores em relação às correntes da espermina.

Na **Fig. 6.10** estão apresentados os voltamogramas de impulso diferencial, registados após os 10 minutos de adsorção espontânea, sem a correcção de linha de base referida na *Secção Experimental 2.2*, de maneira a ilustrar as diferenças nas correntes registadas no processo de oxidação voltamétrica, e a ausência de produtos de oxidação electroactivos no varrimento seguinte.

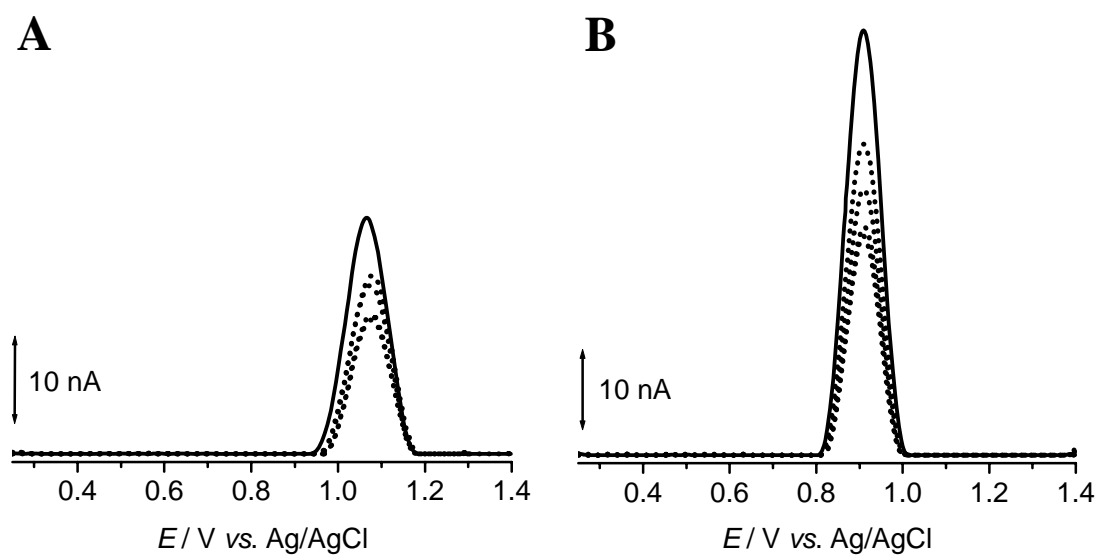


Figura 6.8 – Cinco varrimentos sucessivos numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

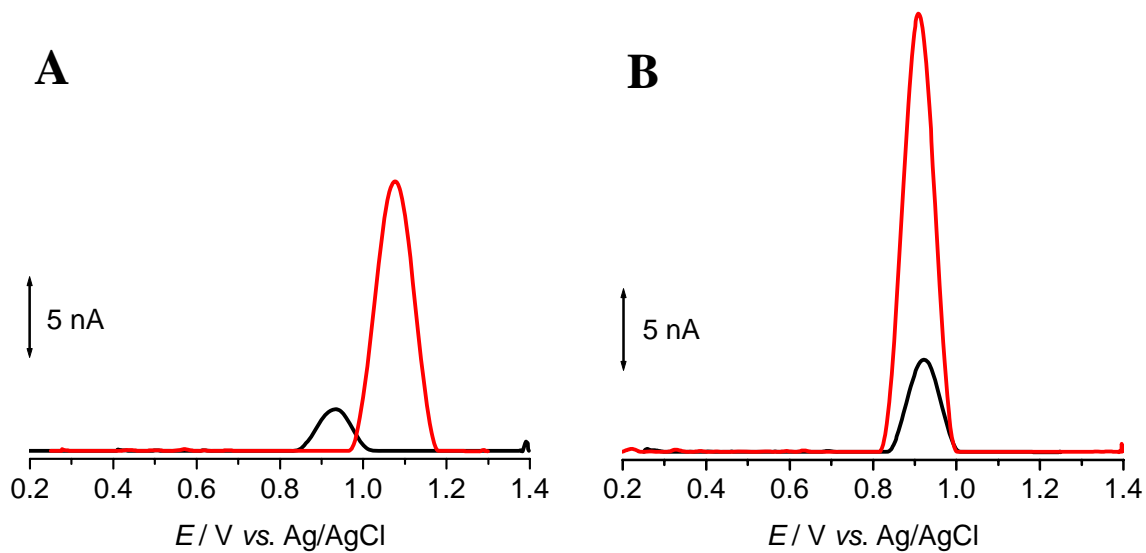


Figura 6.9 – Voltamogramas de impulso diferencial: (—) 5^o varrimento em solução e (—) 1^o varrimento após 10 min. de adsorção espontânea de uma solução de 100 μM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 de **A)** espermidina e **B)** espermina.

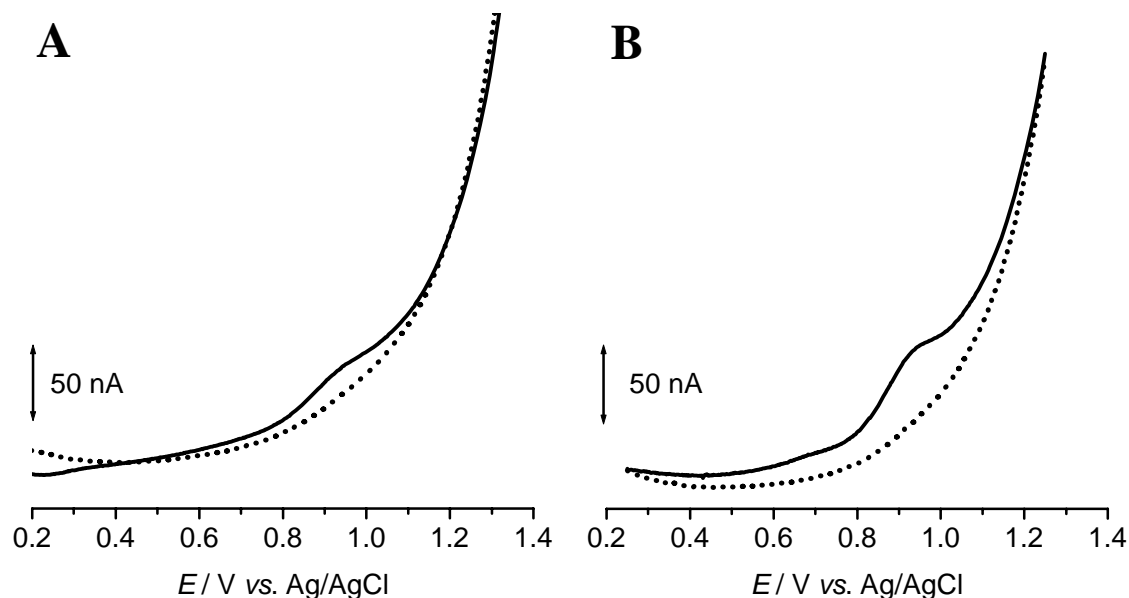


Figura 6.10 – Varrimentos sucessivos no electrólito de suporte pH 7,0 após 10 min. de adsorção espontânea numa solução de 100 μM de: **A)** espermidina e **B)** espermina.

Os resultados obtidos indicam que a variação no potencial de oxidação observada pelas técnicas voltamétricas empregadas não está relacionada com a velocidade de varrimento utilizada. Apesar de se observarem os picos de oxidação mais bem definidos para uma velocidade de varrimento baixa, a discrepância no valor do potencial de oxidação destas poliaminas está relacionada com o processo de desaminação que estas poliaminas apresentam enquanto na solução.

O efeito do pH sobre o valor do potencial e a corrente de oxidação está mostrado na **Fig. 6.11**, para espermidina, e na **Fig. 6.12** para espermina. Os voltamogramas de impulso diferencial mostraram que o potencial do pico de oxidação foi deslocado para valores menos positivos à medida que o pH aumenta, o que indica uma maior facilidade de oxidação em meio alcalino.

Foi também observado que no tampão amónio 0,1 M pH 11,1 foram detectados dois picos de oxidação para cada uma das poliaminas, com correntes baixas em relação aos outros electrólitos de suporte. No tampão acetato 0,1 M pH 5,1, não foi detectado nenhum pico de oxidação no caso da espermidina, enquanto que para a espermina foi detectado um pico de oxidação a $E_{pa} = + 1,23 \text{ V}$, com uma corrente muito baixa de apenas 6 nA.

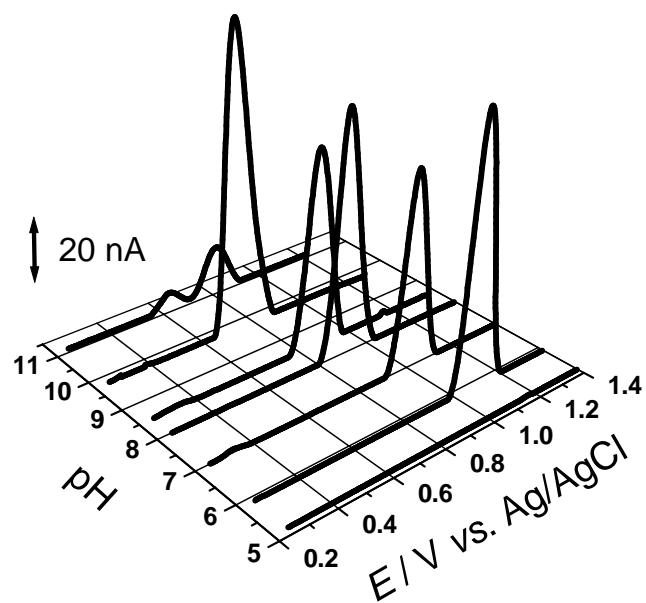


Figura 6.11 – Voltamogramas de impulso diferencial de 100 μ M espermidina em função de pH e do potencial de oxidação.

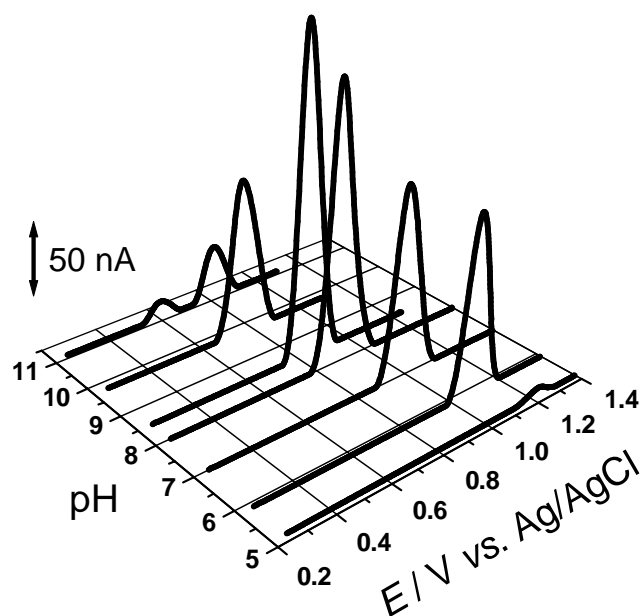


Figura 6.12 – Voltamogramas de impulso diferencial de 100 μ M espermina em função de pH e do potencial de oxidação.

Para electrólitos de suporte com $\text{pH} \leq 5,1$ não foi detectada nenhuma reacção de transferência de carga. O aumento significativo do potencial de oxidação e a diminuição das correntes de pico em meio ácido revela uma baixa capacidade de electro-oxidação destas aminas, que pode ser explicada considerando as suas reacções de protonação. A forma protonada é mais deficiente em electrões do que a forma neutra, não protonada, diminuindo assim a capacidade de oxidação. Os resultados obtidos indicam que em meio ácido as poliaminas estão completamente protonadas, e que dificilmente sofrem oxidação a partir do $\text{pH} 5,1$, como observado pelos elevados potenciais de oxidação e pelos baixos correntes de pico.

O número de electrões envolvidos no processo de oxidação foi calculado da largura a meia-altura $W_{1/2}$ do pico de oxidação, onde $W_{1/2} = 110 \text{ mV}$ no caso da espermidina, e $W_{1/2} = 90 \text{ mV}$ para a espermina, resultando assim que para as duas poliaminas a oxidação ocorre com a transferência de um electrão. Representando E_p vs. pH foi possível observar uma dependência linear do pico de oxidação com o pH no intervalo estudado, **Fig. 6.13**. O declive da recta de 59 mV por unidade de pH para a espermidina e para a espermina, indica que o processo de oxidação implica, além da transferência de um electrão, também a transferência de protões.

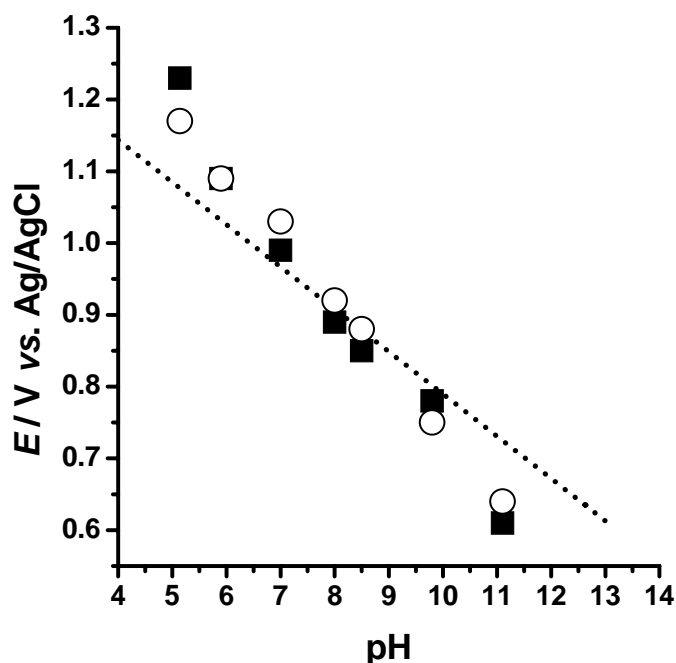
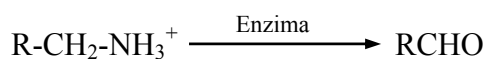


Figura 6.13 – Dependência de E_{pa} com o pH para uma solução de $100 \mu\text{M}$ de (○) espermidina e (■) espermina.

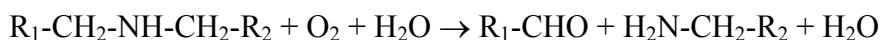
Quando comparando os potenciais de oxidação da espermidina e da espermina, foram encontrados valores muito próximos, o que indica o mesmo mecanismo de oxidação.

In vivo existe uma activa interconversão entre espermina e espermidina, e entre espermidina e putrescina, mediada por enzimas oxidases. Neste ciclo de interconversão catabólica, a espermina é degradada de maneira oxidativa a espermidina, e a espermidina é degradada a putrescina.

O primeiro passo nessa sequência [302], é a acetilação nos grupos amino terminais:



No segundo passo [302] ocorre a separação oxidativa das poliaminas acetiladas, com a remoção de resíduos aminopropil [305]:



Neste caso, uma possível reacção geral [315] no eléctrodo de carbono vítreo é:



Com a deaminação oxidativa dos grupos amino primários, cada um dos intermediários do ciclo de interconversão pode ser transformado num aldeído, que *in vivo* ainda pode sofrer oxidação para um aminoácido ou um gama-lactam. Os produtos do catabolismo terminal, bem como as poliaminas acetiladas são produtos de excreção urinária [305].

6.5 A interacção da espermidina e da espermina com o ADN

Devido as múltiplas cargas positivas que as poliaminas biogénicas espermidina e espermina apresentam em condições fisiológicas, os grupos de fosfato negativamente carregados no ADN são os alvos principais para a interacção destas poliaminas por forças electrostáticas, estabilizando o ADN.

In vitro, estas poliaminas actuam como agentes de compactação e oferecem meios para a purificação dos ácidos nucleicos, sendo assim utilizados para a precipitação selectiva do ADN [291]. A espermidina e a espermina ligam-se nos sulcos da dupla hélice do ADN e reduzem o volume ocupado pelo ADN por quatro a seis ordens de magnitude. *In vivo*, estas poliaminas funcionam como agentes de compactação para o empacotamento do ADN genómico nos espermatozóides, e podem ter uma função similar na entrega de drogas farmacêuticas ao ADN.

A compactação do ADN envolve a neutralização da carga negativa do esqueleto fosfato-açúcar, em combinação com a estabilização das interacções dentro da dupla hélice. O agente de compactação liga-se em qualquer dos sulcos, em contacto directo com os grupos fosfato carregados negativamente. A precipitação ocorre quando hélices adjacentes do ADN são afectadas simultaneamente, com o agente de compactação não só diminuindo a repulsão hélice-hélice, mas também realizando pontes entre as hélices [291].

No presente estudo, a interacção entre o dsDNA e as poliaminas espermidina e espermina foi caracterizada por voltametria de impulso diferencial a fim de investigar a acção destes poliaminas na compactação do ADN e na possível indução de danos oxidativos.

Para o estudo da interacção com o dsDNA, foi preparada uma solução com a concentração de 100 μM de espermidina ou de espermina, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. A concentração utilizada e a força iónica do meio de interacção são muito baixas em relação às condições relatadas na literatura para a precipitação do ADN [291], de 5–10 mM espermidina ou espermina, em 100–200 mM NaCl.

As condições experimentais deste estudo foram escolhidas para ilustrar a informação relevante e de aplicação imediata num estudo de interacção do ADN com

complexos de Pd(II) nos quais estas poliaminas foram empregadas como ligandos, que será apresentado no *Capítulo 7*.

A interacção entre o dsDNA e as poliaminas espermidina e espermina foi realizada em soluções incubadas com 50 mg mL^{-1} dsDNA, em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH $7,0$, por diferentes períodos de tempo. A interacção foi avaliada no electrólito de suporte pH $4,5$, utilizando o eléctrodo de carbono vítreo modificado com uma monocamada do complexo poliamina-ADN formado durante a incubação, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*.

Na **Fig. 6.14** estão apresentados os voltamogramas de impulso diferencial registados para o complexo espermidina-ADN após 2 e 24 horas de incubação. Os resultados mostraram uma diminuição dos picos de oxidação dGuo e dAdo logo após 2 horas de incubação, quando comparado com os picos obtidos para a monocamada do dsDNA de controle.

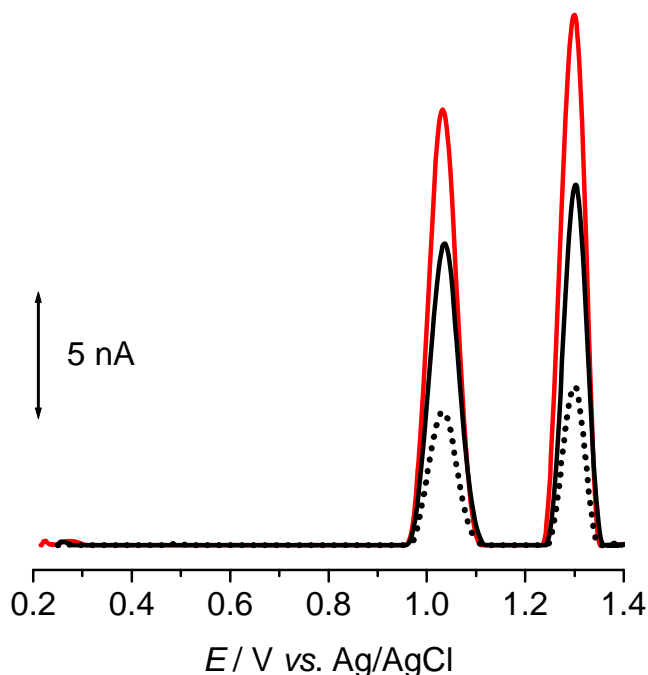


Figura 6.14 – Voltamogramas de impulso diferencial em electrólito de suporte pH $4,5$ com uma monocamada de: (—) dsDNA de controle, e de complexo espermidina-ADN após (—) 2h e (•••) 24 h de incubação com $100 \mu\text{M}$ espermidina.

Após 24 horas de incubação, os voltamogramas mostraram uma diminuição significativa dos picos de oxidação do ADN, mas não foi observado qualquer dano oxidativo no ADN, sendo que não foram detectados picos relacionados com a oxidação da 8-oxoGua ou da 2,8-DHA.

No caso da solução de dsDNA incubada com 100 μM de espermina, **Fig. 6.15**, os voltamogramas registados em electrólito de suporte pH 4,5 mostraram resultados semelhantes aos obtidos para a incubação com a espermidina, ou seja, a diminuição dos picos de oxidação da dGuo e da dAdo com o aumento do tempo de incubação. No entanto, foi observado que esta diminuição é ligeiramente maior, provavelmente devido à existência duma carga positiva adicional no caso da espermina, que oferece mais sítios disponíveis para a ligação ao ADN. Também nesta experiência não foi detectado dano oxidativo causado ao ADN.

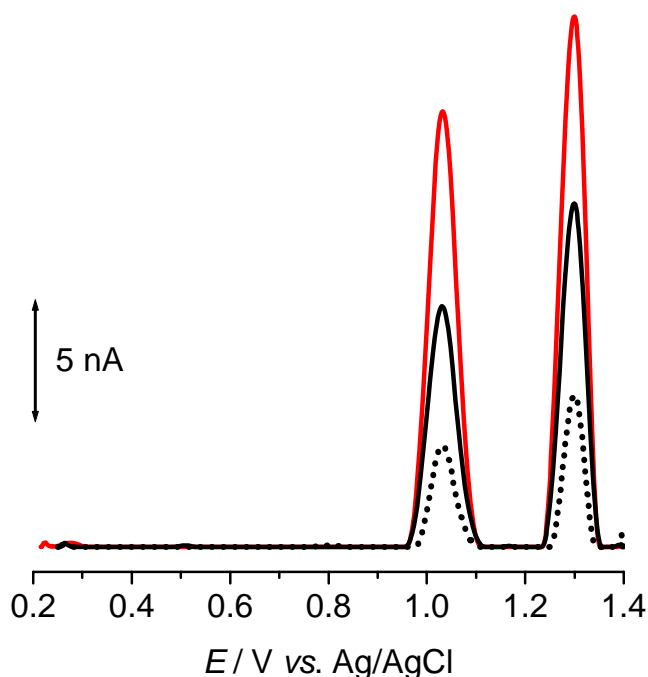


Figura 6.14 – Voltamogramas de impulso diferencial em electrólito de suporte pH 4,5 com uma monocamada de: (—)dsDNA de controle, e de complexo espermina-ADN após (—) 2h e (•••) 24 h de incubação com 100 μM espermidina.

Os resultados obtidos após a incubação do dsDNA com espermidina e espermina mostraram que uma interacção ocorre mesmo para uma concentração baixa de 100 μM , quando comparado as concentrações de nível milimolar presentes nas células ou utilizadas para a precipitação e purificação do ADN. Como era esperado, além da interacção com a dupla hélice do ADN, não foram detectados danos oxidativos ao ADN. Isto indica que as características estruturais das poliaminas são pertinentes no desenvolvimento de novos agentes citotóxicos podendo aumentar a selectividade destes fármacos e oferecer meios para uma interacção eficiente com o ADN no tratamento dos estados neoplásicos.

6.6 Conclusões

O estudo voltamétrico da espermidina e da espermina mostrou que estas poliaminas biogénicas sofrem oxidação no eléctrodo de carbono vítreo. O processo de oxidação é irreversível e dependente de pH. Em meio ácido as poliaminas estão completamente protonadas e dificilmente sofrem oxidação. À medida que o pH das soluções de electrólito de suporte aumenta, o potencial de oxidação tanto da espermidina como da espermina é deslocado para valores menos positivas, o que indica uma maior facilidade de oxidação em meio alcalino.

Devido às suas cadeias policationicas, a espermidina e a espermina interagem especificamente com os grupos de fosfato negativamente carregados da dupla hélice do ADN por forças electrostáticas e estabilizam a sua estrutura. Os resultados voltamétricos mostram que a interacção é observada mesmo para uma concentração baixa destas poliaminas, mas sem causar danos oxidativos ao ADN.

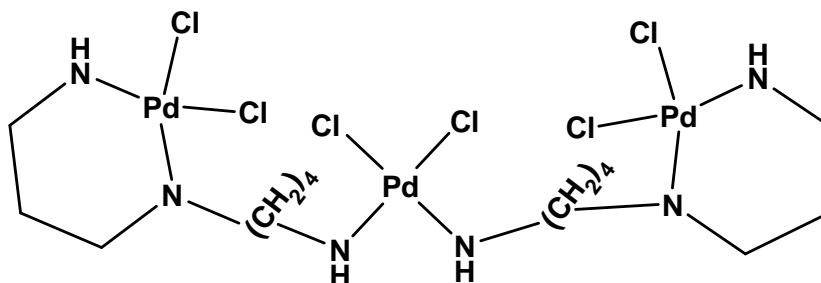
CAPÍTULO 7

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE COMPLEXOS MULTINUCLEARES DE Pd(II) COM POLIAMINAS BIOGÉNICAS. A INTERACÇÃO COM O ADN

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos para o estudo de dois complexos de paládio com as poliaminas biogénicas espermidina e espermina. A estabilidade dos complexos foi testada aplicando um potencial positivo elevado e os resultados foram seguidos por voltametria. Será também apresentado um estudo da interacção destes complexos com o ADN em dupla hélice, a fim de detectar possíveis danos oxidativos causados ao ADN.

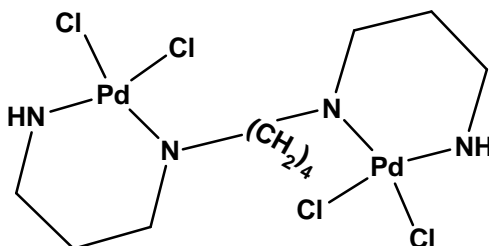
7.1 Introdução

O complexo de paládio com espermidina (Spd – “spermidine”) consiste em três átomos de Pd ligados a duas moléculas de espermidina, **Esquema 7.1**, com a fórmula geral $(\text{PdCl}_2)_3(\text{spd})_2$.



Esquema 7.1 – Representação esquemática do complexo de Pd(II) com duas unidades de espermidina. Adaptado de [246].

O complexo de paládio com espermina (Sp – “spermine”) consiste em dois átomos de Pd e uma única molécula de espermina, **Esquema 7.2**, com a fórmula geral $(\text{PdCl}_2)_2(\text{sp})$.



Esquema 7.2 – Representação esquemática do complexo de Pd(II) com uma unidade de espermina. Adaptado de [244].

Devido à absoluta necessidade de poliaminas para a proliferação celular, a interferência na biossíntese de poliaminas pode ser uma promissora abordagem terapêutica no tratamento de doenças neoplásicas. A investigação no desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos conduziu à síntese de complexos de Pd com diferentes poliaminas e ao estudo das propriedades relacionadas a sua citotoxicidade [245], com o objectivo de conseguir medicamentos quimioterapêuticos de elevada eficácia e especificidade.

A presença das poliaminas como ligandos nestes complexos, com longas cadeias policationicas, pode permitir uma interacção mais eficaz com o ADN, devido à formação de aductos de longa distância [245]. Sendo que as poliaminas são moléculas biogénicas, os complexos também podem apresentar menos efeitos tóxicos, não possíveis pelos agentes alquilantes clássicos, como a cisplatina.

No presente estudo da interacção dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp com o ADN foi utilizado um biossensor electroquímico baseado na modificação superficial de um eléctrodo de carbono vítreo com o ADN em dupla hélice (dsDNA), a investigação sendo direccionada para a detecção electroquímica de possíveis danos oxidativos causados ao ADN.

7.2 Estudo voltamétrico

A caracterização voltamétrica dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp na superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi iniciada com a voltametria cíclica em soluções com uma concentração de 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturadas com N₂.

Na **Fig. 7.1** estão apresentados voltamogramas cíclicos sucessivos na solução de 2 mM Pd(II)-Spd, registados com uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, a partir do potencial $E_1 = 0,00 \text{ V}$, e seguindo no sentido positivo entre o limites de potencial $E_1 = + 1,40 \text{ V}$ e limites de potencial progressivamente mais negativo, $E_2 = - 0,40 \text{ V}$ e $- 0,50 \text{ V}$. Nos varrimentos registados nestas condições não foram observadas reacções de transferência de carga.

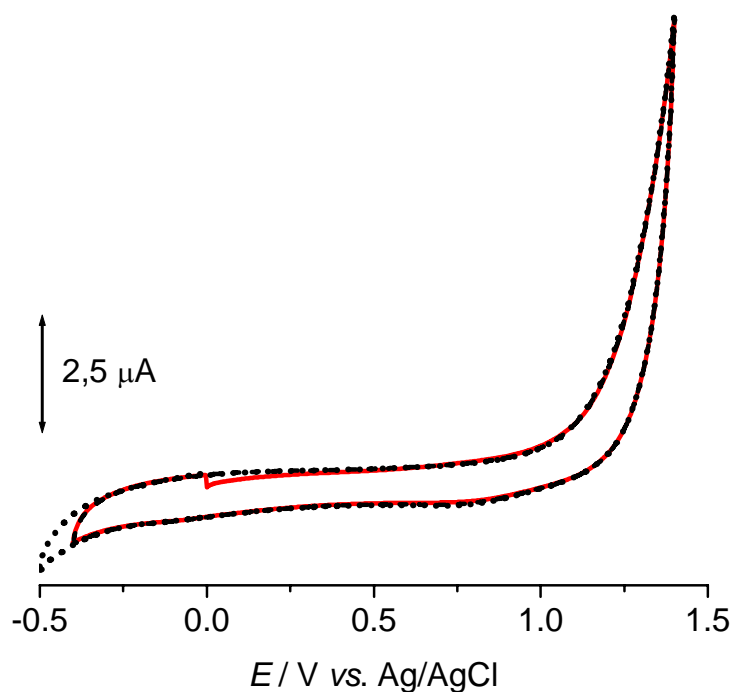


Figura 7.1 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 2 mM Pd(II)-Spd em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1º, (---) 2º e (•••) 3º varrimento.

Após os primeiros três varrimentos, o intervalo de potencial foi aumentado para $E_2 = - 0,60 \text{ V}$, **Fig. 7.2**, e o voltamograma cíclico registado mostrou um comportamento electroquímico mais complexo, característico do paládio electrodepositado na superfície do eléctrodo, como previamente mostrado no *Capítulo 3*.

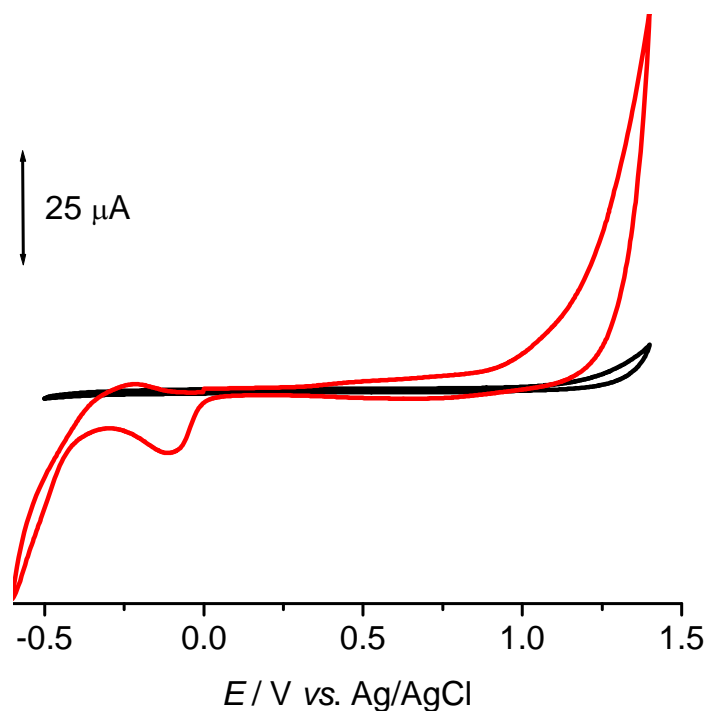


Figura 7.2 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 2 mM Pd(II)-Spd em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 3^o e (—) 4^o varrimento.

Continuando com a aplicação de limites de potencial progressivamente mais negativo, $E_2 = -0,60$ V, $-0,70$ V, $-0,80$ V, $-0,90$ V e $-1,00$ V, **Fig. 7.3**, foi observado um grande aumento nas correntes de pico registados. Todos os picos estão relacionados com os diferentes estados de oxidação das nanoestruturas de Pd(0) electrodepositado na superfície do carbono vítreo quando o potencial aplicado é suficientemente negativo. Uma vez depositado no eléctrodo, as nanoestruturas de paládio sofrem várias reações redox, entre estas distinguindo-se a evolução do hidrogénio, a formação de óxidos de paládio e a redução dos mesmos.

Após os varrimentos na solução de 2 mM Pd(II)-Spd, o eléctrodo foi lavado e transferido para o tampão acetato 0,1 M pH 4,5. Os voltamogramas cíclicos registados só em electrólito de suporte, **Fig. 7.4**, mostraram todos os picos característicos para as nanoestruturas de paládio electrodepositado, sem a contribuição difusiva das espécies presentes na solução do complexo Pd(II)-Spd.

7. Estudo voltamétrico de complexos multinucleares de Pd(II) com poliaminas biogénicas. A interacção com o ADN

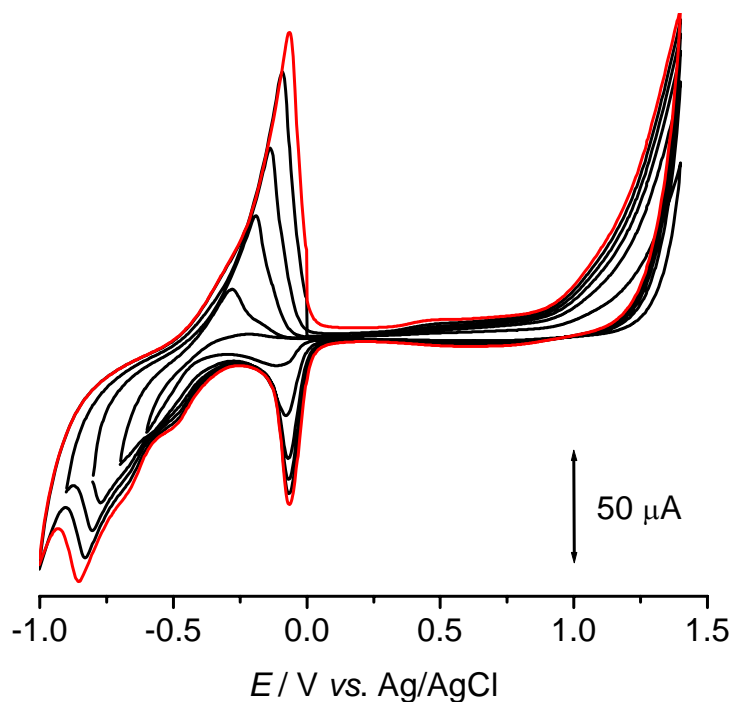


Figura 7.3 – Voltamogramas cíclicos sucessivos numa solução de 2 mM Pd(II)-Spd em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 registados até o limite de potencial negativo de: (—) $-0,60 V$ a $-0,90 V$ e (—) $-1,00 V$.

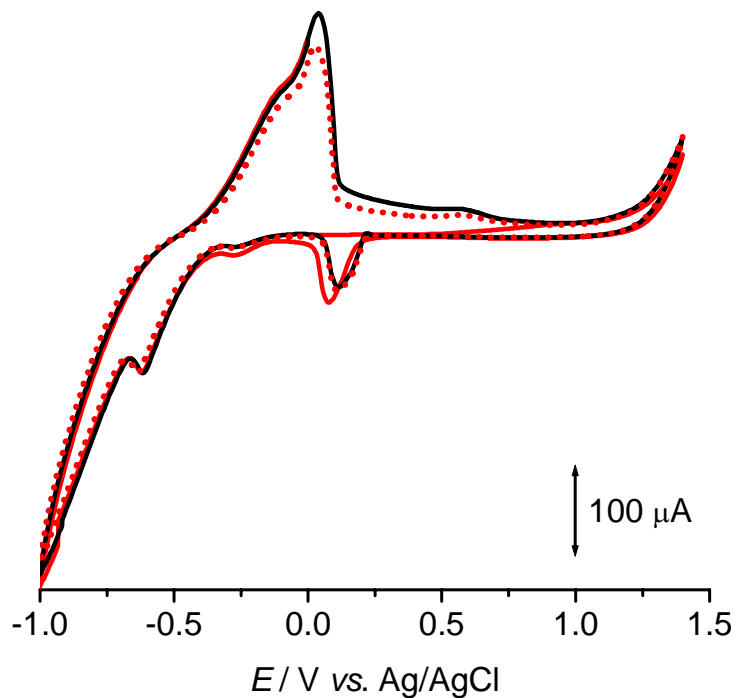


Figura 7.4 – Voltamogramas cíclicos registados após a transferência para o electrólito de suporte pH 4,5: (—) 1º, (—) 2º e (•••) 5º varrimento.

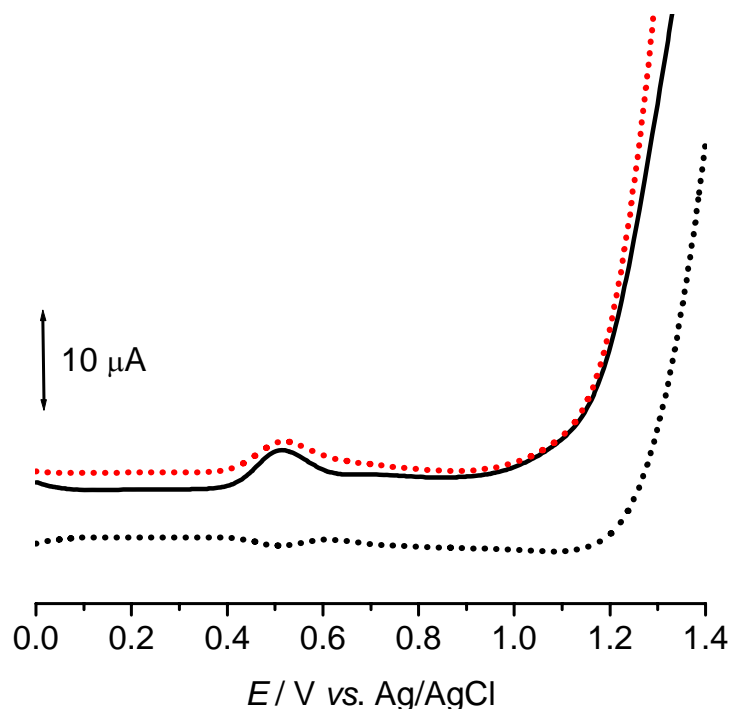


Figura 7.5 – Voltamograma de onda quadrada registado após a transferência para o electrólito de suporte pH 4,5; $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$.

A presença dos óxidos de paládio na superfície do eléctrodo foi confirmada também pela voltametria de onda quadrada, **Fig. 7.5**, onde foram observados processos de oxidação reversíveis, para + 0,51 V e aos potenciais positivos elevados $\approx + 1,20 \text{ V}$.

Em seguida procedeu-se à caracterização voltamétrica do complexo de Pd(II)-Sp, numa solução de 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, saturada com N_2 . Os voltamogramas cíclicos foram registados com uma velocidade de varrimento de $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, seguido-se os mesmos procedimentos que para o estudo do complexo Pd(II)-Spd.

Na **Fig. 7.6** e **Fig. 7.7** estão apresentados os varrimentos registados com limites de potencial progressivamente mais negativos. Foi observado que as reacções de transferência de carga ocorrem do mesmo modo que para o complexo de Pd(II)-Spd, com a electrodeposição do paládio na superfície do eléctrodo quando o potencial chega a valores suficientemente mais negativos para ocorrer a redução das espécies presentes em solução a Pd(0).

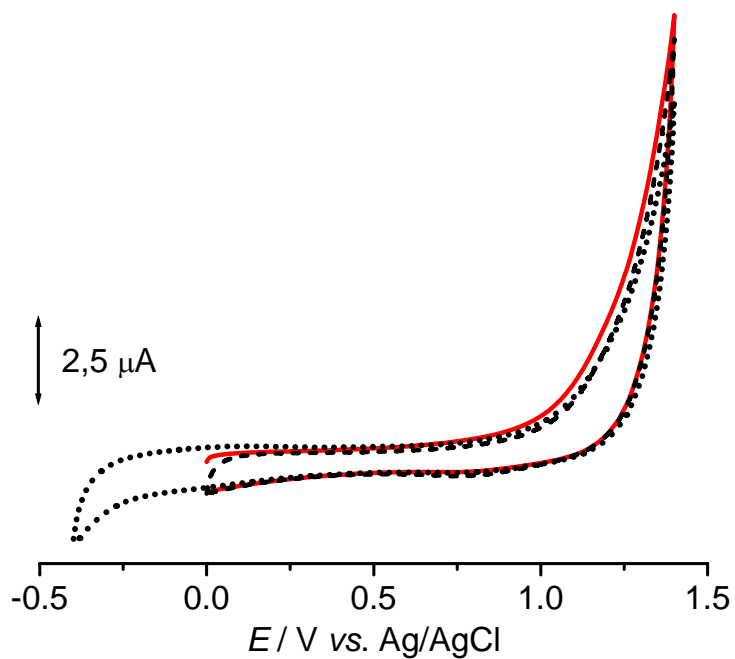


Figura 7.6 – Voltamogramas cíclicos registados numa solução de 2 mM Pd(II)-Sp em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0: (—) 1º, (---) 2º e (···) 3º varrimento.

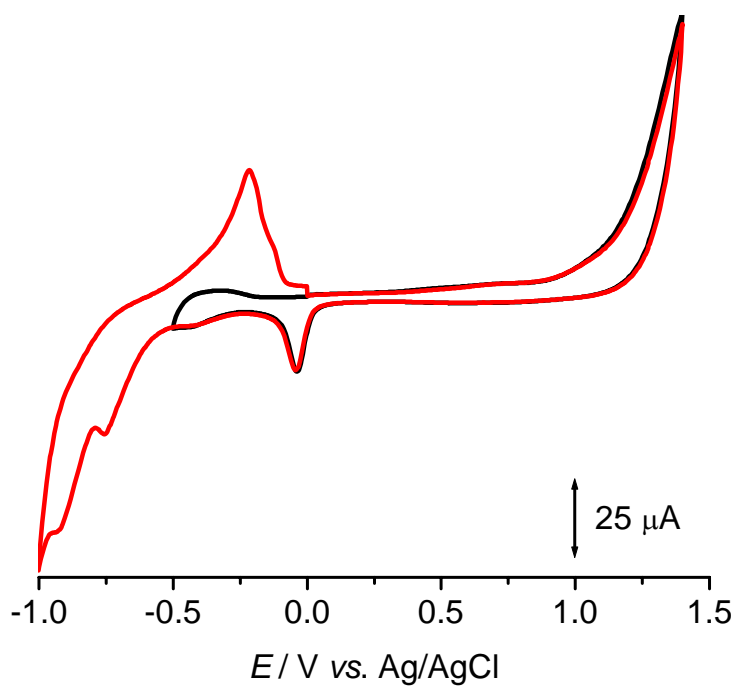


Figura 7.7 – Voltamogramas cíclicos numa solução de 2 mM Pd(II)-Sp em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 registados até o limite de potencial negativo de: (—) -0,50 V e (—) -1,00 V.

No entanto, no caso do complexo Pd(II)-Sp, **Fig. 7.7**, foram observados correntes de pico menores em relação às registadas para o complexo de Pd(II)-Spd, provavelmente relacionado com a presença de três centros de Pd(II) no complexo Pd(II)-Spd, e dois para o complexo de Pd(II)-Sp.

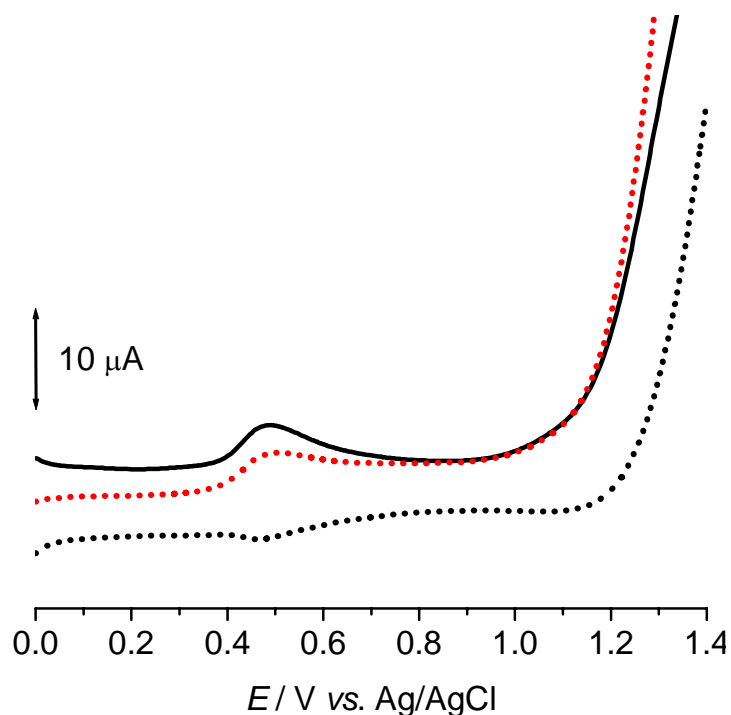


Figura 7.8 – Voltamograma de onda quadrada registado após a transferência para o electrólito de suporte pH 4,5; $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$.

Após a transferência do eléctrodo no electrólito de suporte pH 4,5, também no caso do complexo de Pd(II)-Sp se verificou pela voltamétrie de onda quadrada, **Fig. 7.8**, a presença dos óxidos de paládio, que ocorrem aos mesmos potenciais de + 0,50V e $\approx +1,20 \text{ V}$.

Sendo que nas experiências realizadas com os complexos de Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp foi conseguida a deposição de Pd(0) pela aplicação de um potencial suficientemente negativo, em seguida procedeu-se à aplicação de um potencial positivo elevado, a fim de confirmar que o paládio poderia ser removido a partir destes complexos e depositado directamente como óxido de paládio.

7.3 Electrodeposição dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp

Para testar a estabilidade dos complexos de Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp em relação à remoção do paládio e à deposição na superfície do eléctrodo como óxido de paládio, foi aplicado um potencial de $E_{\text{dep}} = +1,20$ V, durante 30 minutos, em soluções de 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Após a electrodeposição, o eléctrodo de carbono vítreo foi lavado com água e transferido para o electrólito de suporte tampão acetato 0,1 M pH 4,5.

Após a electrodeposição, a partir da solução do complexo Pd(II)-Spd, no primeiro varrimento de voltametria cíclica em sentido positivo não foram observadas reacções de transferências de carga, **Fig. 7.9** (—). Apenas após inversão do varrimento em $E_2 = -1,00$ V foi observado o pico característico para a evolução do hidrogénio, o que significa que mesmo não detectando os óxidos de paládio, a redução destes no varrimento em sentido negativo leva a formação do Pd(0) que então pode adsorver e absorver hidrogénio.

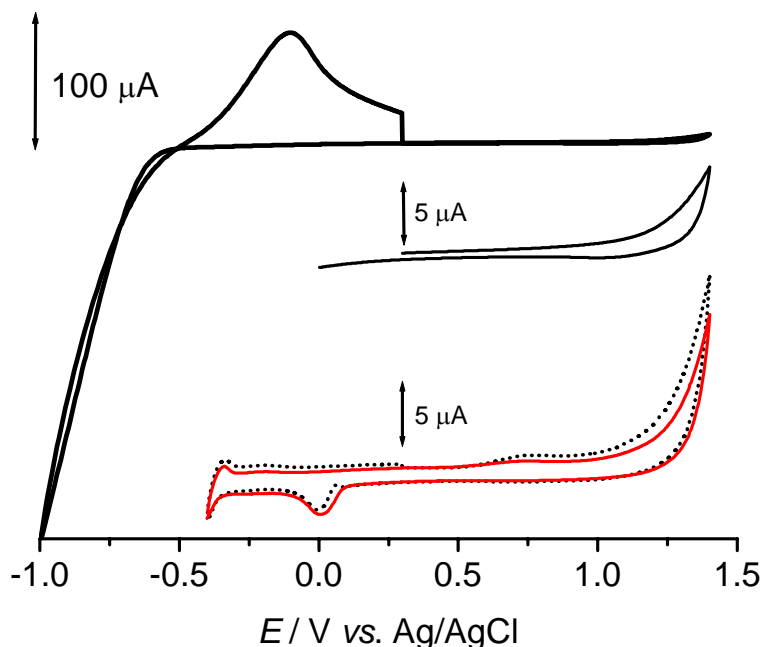


Figura 7.9 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de + 1,20 V numa solução de 2 mM Pd(II)-Spd:

(—) 1°, (•••) 4° e (—) 10° varrimento; $v = 50$ mV s⁻¹.

Nos varrimentos seguintes, após ter diminuído o intervalo de potencial de $-0,40\text{ V}$ a $+1,40\text{ V}$, **Fig. 7.9** (•••) e (—), os voltamogramas registados mostraram a formação da camada dos óxidos e a sua redução, embora com correntes de pico muito baixas.

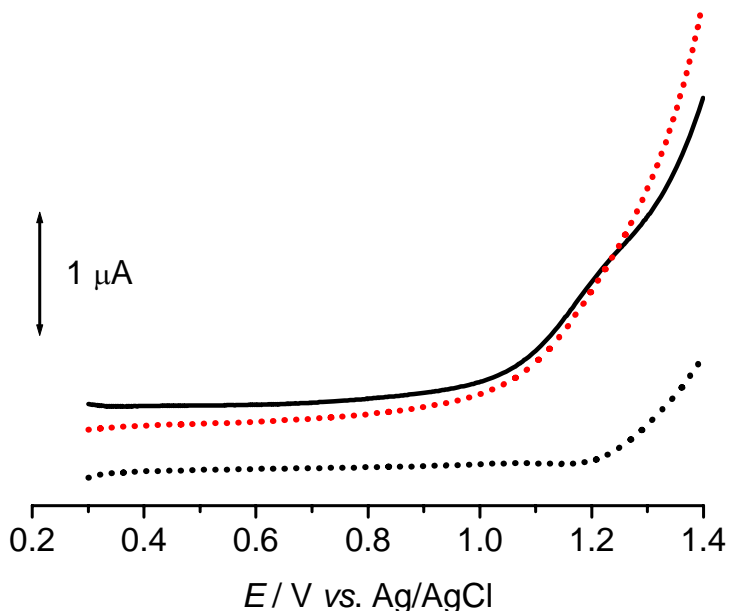


Figura 7.10 – Voltamograma de onda quadrada registado no electrólito de suporte pH 4,5 após a electrodeposição ao potencial $+1,20\text{ V}$, durante 30 min, em 2 mM Pd(II)-Spd ; $v = 15\text{ mV s}^{-1}$.

Numa outra experiência, após electrodeposição ao potencial $E_{\text{dep}} = +1,20\text{ V}$ e a transferência para o electrólito de suporte pH 4,5, **Fig. 7.10**, o primeiro voltamograma de onda quadrada, registado com uma velocidade de varrimento de 15 mV s^{-1} , mostrou a presença de um pico de oxidação reversível ao $+1,20\text{ V}$, com uma corrente muito baixa, confirmando assim a electrodeposição de óxidos de paládio a partir da solução do complexo de Pd(II)-Spd.

No caso do complexo de Pd(II)-Sp, foram obtidos resultados semelhantes ao complexo de Pd(II)-Spd, para a electrodeposição a partir da solução de 2 mM em tampão fosfato $0,1\text{ M}$ pH 7,0. Na **Fig. 7.11** estão apresentados os voltamogramas obtidos após transferência para o electrólito de suporte pH 4,5 que mostram o mesmo comportamento electroquímico, embora com correntes de pico ainda mais baixas para o complexo Pd(II)-Sp.

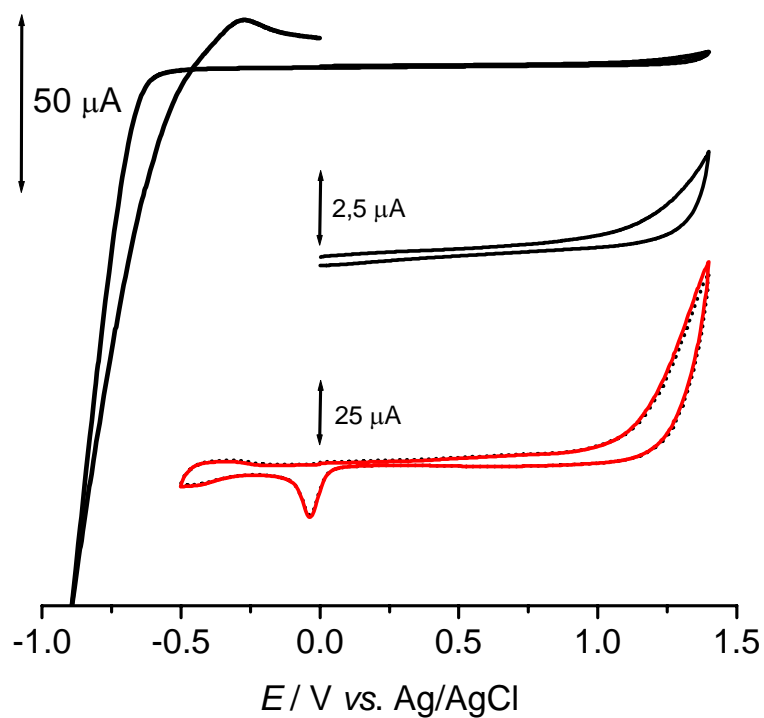


Figura 7.11 – Voltamogramas cíclicas obtidas em electrólito de suporte pH 4,5 após a aplicação do potencial de +1,20 V numa solução de 2 mM Pd(II)-Sp:

(—) 1^o, (•••) 4^o e (—) 10^o varrimento; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

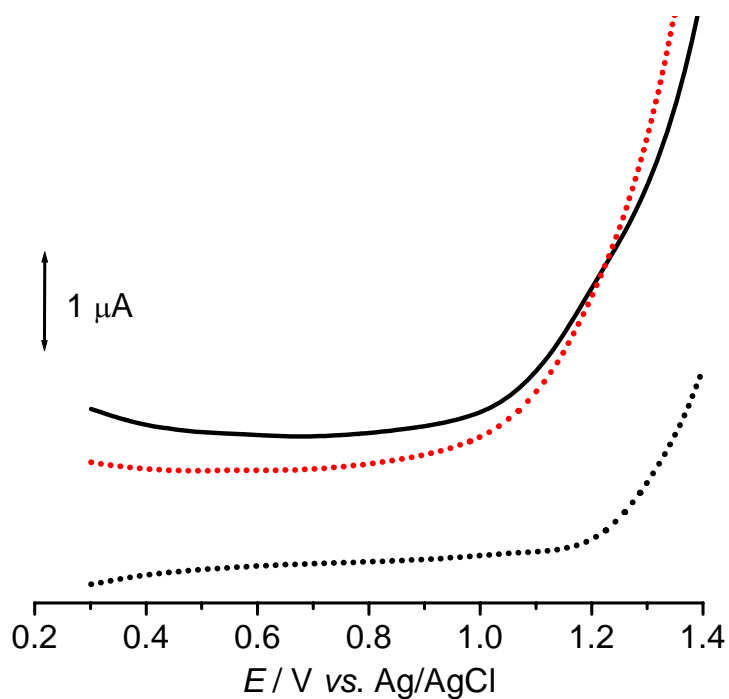


Figura 7.12 – Voltamograma de onda quadrada registado no electrólito de suporte pH 4,5 após a electrodeposição ao potencial +1,20 V, durante 30 min, em 2 mM Pd(II)-Sp; $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$.

Também neste caso não foram observados picos de oxidação no primeiro varrimento anódico, **Fig. 7.11 (—)**, mas a deposição do paládio foi confirmada através da voltametria de onda quadrada, **Fig. 7.12**, que mostrou a formação e a redução dos óxidos ao potencial de +1,20 V, mas com picos menos definidos do que para o complexo de Pd(II)-Spd.

Os resultados obtidos com os complexos de Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp evidenciaram que a aplicação de elevados potenciais negativos, durante os varrimentos em solução, ou positivos, durante a electrodeposição a um potencial fixo, conduz à dissociação dos complexos e à deposição de nanoestruturas de paládio na superfície do eléctrodo.

7.4 A interacção dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp com o ADN

O mecanismo de interacção dos complexos Pd(II)-Spd e Pd(II)-Sp com o ADN em dupla hélice foi caracterizado por voltametria de impulso diferencial a fim de investigar a acção destes complexos na possível clivagem das pontes de hidrogénio e desnaturação do ADN, e na indução de danos oxidativos às bases do ADN.

As alterações observadas nas correntes dos picos de oxidação do dsDNA, dos resíduos de dGuo e de dAdo, foram comparadas com os resultados obtidos para uma solução de dsDNA de controle. Foi também monitorizada a ocorrência dos picos indicadores de dano oxidativo, 8-oxoGua e 2,8-DHA, associados aos produtos de oxidação da guanina e / ou adenina.

Para o estudo da interacção com o dsDNA foram utilizadas soluções de 100 μM do complexo Pd(II)-Spd ou de Pd(II)-Sp em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo esta a concentração utilizada num estudo de interacção de complexos análogos de Pt em linhas celulares de cancro humano [244]. A solução de controle, de 50 mg mL^{-1} dsDNA, foi preparada também em tampão fosfato pH 7,0 e analisada após os mesmos períodos de tempo que para o estudo de interacção dos complexos de Pd(II)-Spd ou de Pd(II)-Sp com o dsDNA.

A primeira abordagem foi investigar o efeito da interacção destes complexos em incubações de curta duração. A superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi modificada

com uma monocamada de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ dsDNA, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*.

Em seguida, o eléctrodo modificado foi incubado durante 5, 10 e 30 minutos com as soluções de $100 \mu\text{M}$ do complexo Pd(II)-Spd ou Pd(II)-Sp, em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ pH 7,0. Após a incubação, o excesso de solução foi retirado com água desionizada para garantir a remoção das moléculas de complexo não intercaladas no filme de dsDNA antes da transferência do eléctrodo para o electrólito de suporte. Este procedimento garante que os sinais voltamétricos registados são devidos apenas à interacção complexo-ADN, formado durante a incubação, sem a contribuição difusiva de espécies da solução.

A interacção do complexo Pd(II)-Spd com o ADN foi inicialmente estudada após a incubação durante 5 minutos na solução de $100 \mu\text{M}$ de complexo Pd(II)-Spd. Os voltamogramas registados no electrólito de suporte pH 4,5, **Fig. 7.13**, mostraram uma diminuição dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, significativa no caso dos resíduos de guanina quando comparado com os picos de oxidação do dsDNA de controle.

Além deste efeito, foi também observado um outro pico de oxidação ao potencial de $+ 0,80 \text{ V}$, cuja corrente aumentou com o aumento do tempo de incubação para 10 minutos, correspondente a oxidação da base livre de guanina [36]. No entanto, não foram encontrados picos relacionados com a presença dos biomarcadores de dano oxidativo, 8-oxoGua ou 2,8-DHA.

A interacção do complexo de Pd(II)-Sp com o dsDNA mostrou um efeito similar, ou seja, uma diminuição dos picos do ADN após a interacção, notável quando comparado com os sinais voltamétricos do dsDNA de controle, **Fig 7.14**, mas a diminuição das correntes foi menor em relação ao efeito detectado para a interacção com o complexo de Pd(II)-Spd.

Todavia, também no caso da interacção com o complexo de Pd(II)-Sp foi detectado o pico de oxidação a $+ 0,80 \text{ V}$, relacionado com a oxidação da base livre de guanina. Por isso, com uma outra monocamada de dsDNA, o tempo de incubação com o complexo de Pd(II)-Sp foi aumentado para 30 minutos. Foi observado que os picos da dGuo e dAdo continuaram a diminuir com o aumento do tempo de incubação, enquanto a corrente do pico da guanina livre aumentou.

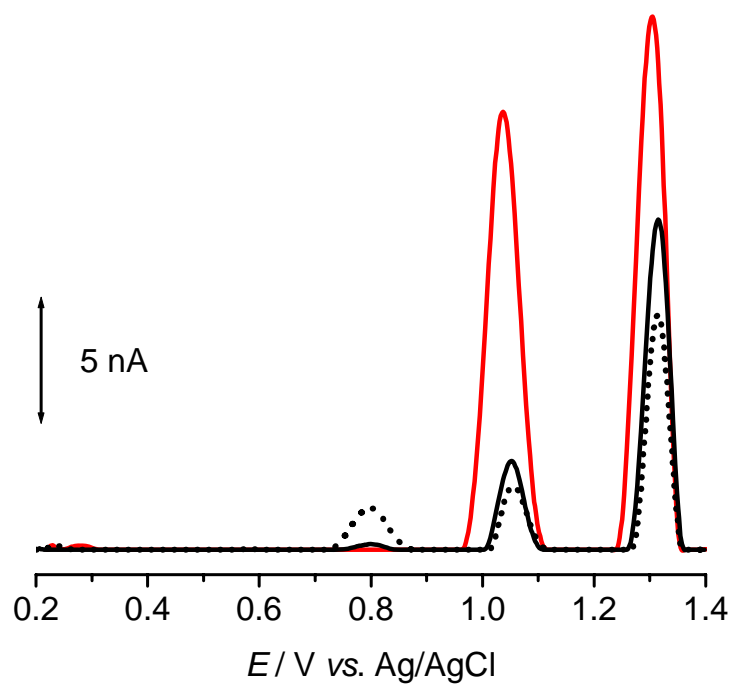


Figura 7.13 – Voltamogramas de impulso diferencial de uma monocamada de: (—) dsDNA de controle, e incubada com o complexo de Pd(II)-Spd após (—) 5 e (•••) 10 min.

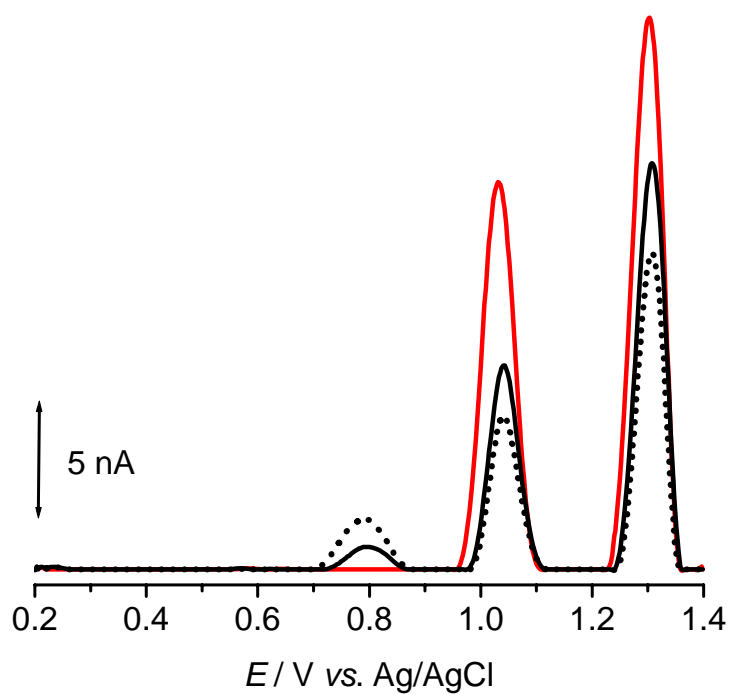


Figura 7.14 – Voltamogramas de impulso diferencial de uma monocamada de: (—) dsDNA de controle, e incubada com o complexo de Pd(II)-Sp após (—) 10 e (•••) 30 min.

Numa outra experiência, foram preparados separadamente eléctrodos modificados com uma monocamada de ADN – complexo Pd(II)-Spd ou de ADN – complexo Pd(II)-Sp, como descrito na *Secção Experimental 2.3.2*, a partir duma solução de dsDNA incubada com 100 μM de complexo Pd(II)-Spd ou Pd(II)-Sp, durante 12 horas, **Fig. 7.15**.

Os voltamogramas registrados em electrólito de suporte pH 4,5 confirmaram o que foi observado nas experiências anteriores com incubações de tempo curto. Uma diminuição apreciável dos picos de oxidação dGuo e dAdo após 12 horas foi observada no caso da solução de dsDNA incubada com o complexo de Pd(II)-Sp, e a ausência de picos foi verificada para a solução de dsDNA incubada com o complexo de Pd(II)-Spd. Os voltamogramas obtidos mostram ainda que para a solução de dsDNA incubada com o complexo de Pd(II)-Sp ocorre o pico de oxidação da guanina livre, enquanto que para a incubação com o complexo Pd(II)-Spd o sinal voltamétrico deste pico é muito baixo. No entanto, não foi detectado nenhum dano oxidativo causado ao ADN.

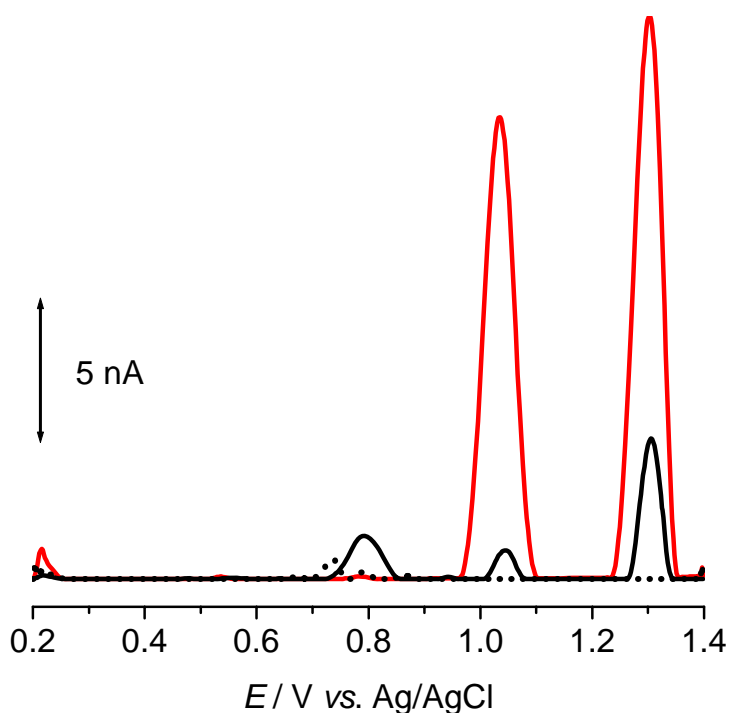


Figura 7.15 – Voltamogramas de impulso diferencial de uma monocamada de:
(—) dsDNA de controle após 12 h da preparação,
e de ADN incubado por 12 h com (—) Pd(II)-Sp e (•••) Pd(II)-Spd.

Os resultados obtidos indicam que a interacção tanto do complexo de Pd(II)-Spd como de Pd(II)-Sp com o dsDNA segue o mesmo mecanismo, embora com uma cinética mais lenta para o complexo Pd(II)-Sp. Este efeito é explicado pelas diferenças estruturais destes dois complexos.

O Pd(II)-Spd, além de ser um complexo trinuclear de tipo cisplatina [245], ou seja, com mais um centro alquilante bifuncional do que o complexo Pd(II)-Sp, tem também uma geometria mais alongada devido a presença das duas unidades de espermidina, o que pode favorecer a interacção com o ADN. O complexo de Pd(II)-Sp contém duas unidades idênticas, cada uma com um centro bifuncional de Pd ligado aos átomos de azoto duma única molécula de espermina. Para ambos complexos, todos os átomos de azoto se encontram coordenados com os centros de Pd [244], o que afecta a mobilidade e a capacidade de efectuar interacções electrostáticas com os grupos fosfato negativamente carregados da dupla hélice do ADN. No entanto, estes complexos e os seus análogos de Pt mostraram ser eficientes em linhas celulares de cancro humano [244], num mecanismo provavelmente relacionado com a presença dos múltiplos centros de alquilação. No caso do Pd(II)-Spd, o complexo mostrou uma actividade maior do que o seu análogo de Pt [245].

Devido à existência destes múltiplos centros de alquilação, com seis possíveis sítios de coordenação na dupla hélice do ADN para o Pd(II)-Spd, e quatro para o Pd(II)-Sp, estes complexos têm uma elevada afinidade para formar ligações covalentes com as bases azotadas e capacidade de induzir mudanças estruturais no B-ADN. A interacção com as bases do ADN foi detectada para ambos complexos através da diminuição dos picos de oxidação da dGua e dAdo, mas mostrou a ser maior no caso da interacção com o complexo de Pd(II)-Spd. A interacção levou ainda à libertação da base guanina, o que indica a clivagem das pontes de hidrogénio e possivelmente a realização de ligações cruzadas entre as cadeias do ADN.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem assim uma correlação entre a estrutura destes complexos e a interacção com o ADN, fundamental no desenvolvimento de fármacos citotóxicos eficazes e selectivos.

7.5 Conclusões

Os resultados voltamétricos apresentados demonstraram a interacção do dsDNA com o complexo de Pd(II)-Spd e de Pd(II)-Sp. A interacção é muito rápida e estável, principalmente no caso do complexo Pd(II)-Spd, e relacionada com a desnaturação local da dupla hélice e a libertação da base guanina, mas sem causar danos oxidativos no ADN. As diferenças observadas sugerem uma correlação entre a estrutura destes complexos e a interacção com o ADN.

O estudo voltamétrico dos complexos de Pd(II)-Spd e de Pd(II)-Sp mostrou a remoção do paládio e a sua deposição no eléctrodo de carbono vítreo após a aplicação de potenciais negativos elevados, durante os varrimentos em solução, ou da electrodeposição a um potencial positivo fixo elevado. Estes procedimentos conduziram à dissociação dos complexos e à deposição de nanoestruturas de paládio na superfície do eléctrodo.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES

A investigação realizada neste trabalho foi direccionada para o estudo sistemático, utilizando técnicas voltamétricas, dos processos de eléctrodo envolvidos na oxidação e redução de complexos de paládio com ligandos biológicos. Foi dada particular atenção à interacção *in situ* destes complexos com o ADN em dupla hélice, para uma melhor compreensão do mecanismo de acção *in vivo* sobre o ADN. O estudo electroquímico dos complexos de paládio e dos seus componentes, o paládio, o ácido α -lipóico e as poliaminas espermina e spermidina, foi essencial na avaliação do mecanismo de interacção destes complexos com a dupla hélice do ADN.

O estudo voltamétrico do paládio foi efectuado utilizando um eléctrodo de carbono vítreo em soluções de PdCl_2 , PdSO_4 , $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e K_2PdCl_4 . O comportamento electroquímico do paládio é complexo e relacionado com os diferentes estados de oxidação do paládio, Pd(0), Pd(II) e Pd(IV). Durante os varrimentos voltamétricos ocorrem vários processos redox que foram indentificados com a redução da espécie de Pd^{2+} para paládio metal, a adsorção e absorção de hidrogénio molecular, adsorção e absorção de oxigénio, formação de óxidos e a dissolução do metal. Experiências complementares de microscopia de força atómica relacionaram estes processos redox com a formação de nanoestruturas. O controlo de diferentes parâmetros, como o potencial aplicado e a concentração das soluções utilizadas, permite a obtenção de nanoparticulas, nanofios ou filmes, nanoestruturas com possíveis aplicações em electrocatálise, nanotecnologia, armazenamento de hidrogénio e pilhas de combustível.

No que respeita à interacção do paládio com o ADN, os catiões de Pd²⁺ têm uma elevada afinidade para os grupos fosfato da dupla hélice e para formar ligações covalentes com os átomos de azoto das bases do ADN. O efeito imediato é uma desnaturação local que permite a ocorrência de sítios secundários de ligação. Na sequência deste mecanismo realizam-se ligações cruzadas entre as cadeias e ocorre a agregação do ADN. A interacção é muito rápida e estável, demonstrada pela diminuição dos sinais voltamétricos do ADN após incubações, na ordem de poucos minutos, e altera completamente a estrutura de B-ADN. O resultado é ainda mais significativo considerando que este efeito é observado para concentrações de apenas 10 µM Pd²⁺. No entanto, devido à ausência dos sinais relacionados com os produtos de degradação das bases purínicas, 8-oxoguanina e 2,8-dihidroxiadenina, ficou demonstrado que a interacção não conduz à ocorrência de danos oxidativos.

A oxidação do ácido α-lipóico foi estudada em vários electrólitos de suporte utilizando um eléctrodo de carbono vítreo sem o uso de mediadores. O processo de oxidação é independente do pH e ocorre numa única etapa irreversível com a transferência de um electrão. Foi desenvolvido um método electroquímico para uma determinação directa do conteúdo de ácido α-lipóico livre em amostras comerciais, seguindo a sua oxidação para ácido β-lipóico.

A interacção com o ADN de um complexo de Pd-ácido lipóico foi estudada em soluções incubadas e utilizando um eléctrodo de carbono vítreo modificado com ADN em dupla hélice. Ficou demonstrado que o complexo de Pd-ácido lipóico, *per se* e dentro de um trímero com tiamina, presente no suplemento nutritivo *Poly-MVA™*, interage com o ADN sem causar danos oxidativos. O estudo voltamétrico do complexo de Pd-ácido lipóico observado após a aplicação de elevados potenciais negativos mostrou um comportamento redox muito complexo que foi associado com a deposição de nanopartículas de Pd(0) e a dissociação do complexo na superfície do eléctrodo. A aplicação de elevados potenciais positivos conduziu à oxidação do complexo e à formação de uma camada de ácido lipóico oxidado e de óxidos de paládio. A remoção do paládio a partir de uma solução de *Poly-MVA™* não foi conseguida, devido ao paládio estar confinado na estrutura polimérica do complexo com tiamina.

Foi também realizado um estudo voltamétrico de oxidação directa das poliaminas biogénicas espermidina e espermina, efectuado com o eléctrodo de carbono vítreo sem o uso de mediadores, em diferentes electrólitos de suporte. Ficou demonstrado que à medida que o pH aumenta, o processo de oxidação ocorre para valores de potencial menos positivos, o que indica uma maior facilidade de oxidação em meio alcalino. Em meio ácido, o aumento significativo do potencial de oxidação e a diminuição das correntes registadas revela uma baixa capacidade de electro-oxidação, relacionada com a completa protonação destas poliaminas. Nesta configuração, os policatiões influenciam a conformação das macromoléculas biológicas através de interacções electrostáticas com sítios aniónicos específicos, principalmente como os grupos fosfato carregados negativamente do ADN. A técnica voltamétrica de impulso diferencial foi utilizada para seguir a interacção da espermidina e da espermina com o ADN em dupla hélice, em incubações de curta e longa duração. Os resultados obtidos confirmaram a ocorrência da interacção com o ADN através da diminuição significativa dos seus sinais voltamétricos, o que demonstra a capacidade de compactação destas poliaminas mesmo para uma concentração baixa em relação aos níveis celulares, sem causar danos oxidativos ao ADN.

Neste trabalho foram também estudados por métodos voltamétricos os processos envolvidos na oxidação e na redução de complexos de Pd com ligandos de espermidina ou de espermina. Com a aplicação de potenciais suficientemente negativos para a redução das espécies presentes nas soluções de Pd-espermidina ou de Pd-espermina, ocorre a electrodeposição de Pd(0) na superfície do eléctrodo de carbono vítreo. Uma vez depositado no eléctrodo, o paládio sofre as reacções redox características à: evolução do hidrogénio, formação e redução de óxidos de paládio. A aplicação de um potencial positivo elevado também conduz à remoção do paládio e à sua deposição na superfície do eléctrodo. No que respeita à interacção do complexo de Pd-espermidina ou de Pd-espermina com o ADN, os resultados voltamétricos demonstraram uma interacção muito rápida e estável, principalmente no caso do complexo Pd-espermidina, relacionada com a desnaturação local da dupla hélice e a libertação da base guanina, mas sem causar danos oxidativos no ADN. A diminuição notável dos picos de oxidação do ADN em conjunto com a ocorrência do sinal voltamétrico corespondente à oxidação da base livre de guanina, indica a clivagem das pontes de hidrogénio e possivelmente a

realização de ligações cruzadas entre as cadeias do ADN. O efeito é semelhante com o resultado obtido no estudo da interacção entre os iões de Pd²⁺ e o ADN, e sugere que uma agregação e condensação do ADN pode ocorrer também no caso da interacção entre os complexos de Pd-poliaminas com o ADN. No entanto, as diferenças observadas para a interacção do ADN com o complexo de Pd-espermidina em relação ao complexo de Pd-espermina, indicam uma correlação entre a estrutura destes complexos e a eficácia da interacção com o ADN

Numa perspectiva ligada ao melhoramento da qualidade de vida, o uso de um eléctrodo de carbono vítreo modificado com ADN em dupla hélice permite a investigação rápida e de baixo custo dos efeitos de diversas fontes de dano sobre o material genómico com a determinação de lesões no ADN. Os métodos voltamétricos revelaram-se ferramentas adequadas para a caracterização e a avaliação dos mecanismos de interacção de iões, moléculas e fármacos com o ADN, devido à capacidade de análise directa, em tempo real, dos processos que ocorrem na superfície do eléctrodo. Os resultados electroquímicos permitem detectar os danos causados ao ADN imobilizado na superfície do eléctrodo, e podem contribuir para uma melhor compreensão dos processos de interacção que ocorrem *in vivo*. Em complemento com outras técnicas permitem elucidar o mecanismo dessa interacção e possibilitam o desenvolvimento de novas moléculas de potencial uso farmacológico com elevada eficácia e selectividade.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P.A. Levene, R.S. Tipson (1935) *J. Biol. Chem.* 109:623-630.
- [2] O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty (1979) *J. Exp. Med.* 149:297-326.
- [3] J.D. Watson, A. Berry (2003) *DNA The secret of life.* Random House, New York.
- [4] J.D. Watson, F.H.C. Crick (1953) *Nature* 171:737-738.
- [5] M.H.F. Wilkins, A.R. Stokes, H.R. Wilson (1953) *Nature* 171:738-740.
- [6] R. Franklin, R.G. Gosling (1953) *Nature* 171:740-741.
- [7] W. Saenger (1984) *Principles of nucleic acid structure.* Springer Advanced Text in Chemistry. C.R. Cantor (ed). Springer-Verlag, New York.
- [8] R.H. Garrett, C.M. Grisham (1999) *Biochemistry*, 2nd ed. Saunders College Publishing, Fort Worth.
- [9] A.J.F. Griffiths, W.M. Gelbart, J.H. Miller, R.C. Lewontin (1999) *Modern Genetic Analysis.* W.H. Freeman & Co., New York.
- [10] H.F. Gilbert (2000) *Basic Concepts in Biochemistry*, 2nd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- [11] J. Koolman, K.-H. Roehm (2005) *Color Atlas of Biochemistry* 2nd ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [12] S. Arnott, D.W.L. Hukins (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47:1504-1510.
- [13] A.H.J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich (1979) *Nature* 282:680-686.
- [14] V.N. Soyfer, V.N. Potaman (1996) *Triple-helical Nucleic Acids.* R.C. Garber (ed). Springer-Verlag, New York.
- [15] D.E. Metzler (2002) *Biochemistry*, 2nd ed. Elsevier Academic Press.
- [16] J.R. Williamson (1993) *P. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3124.
- [17] M.C. Poirier, A. Weston, R.B. Joseph (2002) *DNA Damage, DNA Repair,, Mutagenesis.* Encyclopedia of Cancer. Academic Press, New York.
- [18] D.J. Krosky, J.T. Stivers, J.L. William, M.D. Lane (2004) *DNA Glycosylases: Mechanisms.* Encyclopedia of Biological Chemistry. Elsevier, New York.
- [19] J.H. Miller, B. Sydney, H.M. Jeffrey (2001) *DNA lesions.* Encyclopedia of Genetics. Academic Press, New York.

- [20] A.B. Guliaev, B. Singer, J.L. William, M.D. Lane (2004) DNA Damage: Alkylation. Encyclopedia of Biological Chemistry. Elsevier, New York.
- [21] D.O. Zharkov, A.P. Grollman, B. Sydney, H.M. Jeffrey (2001) Repair of Oxidative DNA Damage. Encyclopedia of Genetics. Academic Press, New York.
- [22] J. Cadet (2000) CLEFS CEA 43:10-17.
- [23] A. Weston, M.C. Poirier, W. Philip (2005) Carcinogen-DNA Adduct Formation, DNA Repair. Encyclopedia of Toxicology. Elsevier, New York.
- [24] G. Fang, T.R. Cech (1993) Biochemistry 32:11646-11657.
- [25] M. Gellert, M.N. Lipsett, D.R. Davies (1962) P. Natl. Acad. Sci. USA 48:2013-2018.
- [26] L. Frydman, P.C. Rossomando, V. Frydman, C.O. Fernandez, B. Frydman, K. Samejima (1992) P. Natl. Acad. Sci. USA 89:9186-9190.
- [27] S. Jain, G. Zon, M. Sundaralingam (1989) Biochemistry 28:2360-2364.
- [28] D. Bancroft, L.D. Williams, A. Rich, M. Egli (1994) Biochemistry 33:1073-1086.
- [29] S.R. Rajski, S. Kumar, R.J. Roberts, J.K. Barton (1999) J. Am. Chem. Soc. 121:5615-5616.
- [30] H.-W. Fink, C. Schonenberger (1999) Nature 398:407-410.
- [31] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (1999) Free Radicals in Biology, Medicine, 3rd ed. Oxford University Press.
- [32] J.-H. Lin, P.R. LeBreton, L.L. Shipman (1980) Carcinogenesis 84:642-649.
- [33] K. Takano, T. Nakamura, M. Sekiguchi (1991) Mutation Res./DNA Repair 254:37-44.
- [34] A.M.O. Brett, S.H.P. Serrano (1997) Development of DNA-based biosensors for carcinogens. Biosensors. P. Frangopol, D.P. Nikolelis, U.J. Krull (eds). Al. I.Cuza University Press, Iasi, Romania.
- [35] A.M.O. Brett, V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, S.H.P. Serrano, S. Alegret, A. Merkoçi (2007) Chapter 20 DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage. Comprehensive Anal. Chem.. Elsevier.
- [36] A.M.O. Brett, S.H.P. Serrano, J.A.P. Piedade (1999) Electrochemistry of DNA. Applications of Kinetic Modelling. R.G. Compton, G. Hancock (eds). Elsevier, Oxford.

- [37] E. Palecek (**2002**) *Talanta* 56:809-819.
- [38] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, V. Vetterl (**2002**) Electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochem.*. The Encyclopedia of Electrochemistry. A.J. Bard, M. Stratmann (eds). Wiley-VCH.
- [39] A.M.O. Brett (**2005**) DNA-based biosensor. *Biosensors, Modern Specific Analytical Techniques*. L. Gorton (ed). Elsevier.
- [40] A.M.O. Brett (**2007**) Electrochemistry for probing DNA damage. *Encyclopaedia of Sensors*. C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko (eds). American Scientific Publishers, USA.
- [41] H. Berg (**1985**) *Electrochemistry of Biopolymers*. Plenum Press, New York.
- [42] S.O. Kelly, N. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton (**1999**) *Angew. Chem. Int. En. Ed.* 38:941-945.
- [43] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, S.H.P. Serrano (**1994**) *J. Electroanal. Chem.* 366:225-231.
- [44] E. Palecek (**1960**) *Nature* 188:656-657.
- [45] G. Dryhurst P.J. Elving (**1969**) *Talanta* 16:855-874.
- [46] P. Singhal, W.G. Kuhr (**1997**) *Anal. Chem.* 69:4828-4832.
- [47] P. Valenta, H.W. Nürnberg (**1974**) *J. Electroanal. Chem.* 49:55-75.
- [48] E. Palecek (**1980**) *Anal. Biochem.* 108:129-138.
- [49] E. Palecek, I. Postbieglová (**1986**) *J. Electroanal. Chem.* 214:359-371.
- [50] A.M.O. Brett, F.-M. Matysik (**1997**) *J. Electroanal. Chem.* 429:95-99.
- [51] A.M.O. Brett, F.-M. Matysik (**1997**) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42:111-116.
- [52] G. Dryhurst ,P.J. Elving (**1968**) *J. Electrochem. Soc.* 115:1014-1020.
- [53] G. Dryhurst (**1971**) *Anal. Chim. Acta* 57:137-149.
- [54] E. Palecek (**1996**) *Electroanalysis* 8:7 - 13.
- [55] A.M.O. Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu (**2004**) *Anal. Biochem.* 332:321-329.
- [56] A. Collins, J. Cadet, B. Epe, C. Gedik (**1997**) *Carcinogenesis* 18:1833-1836.

- [57] A.P. Grollman, D.O. Zharkov, J.L. William, M.D. Lane (2004) DNA Oxidation. Encyclopedia of Biological Chemistry. Elsevier. New York.
- [58] R. Olinski, T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokowski, W. Zegarski, M. Dizdaroglu (1992) FEBS Lett. 309:193-198.
- [59] H. Kamiya, H. Kasai (1995) J. Biol. Chem. 270:19446-19450.
- [60] H. Kasai, H. Kamiya, N. Murata-Kamiya, T. Hirano, R. Yamaguchi, S. Asami, M. Inoue, Y. Tsurudome (1997) Mutation Res.379:S165-S165.
- [61] R.N. Goyal, A. Kumar, A. Mittal (1991) J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2:1369-1375.
- [62] A.M.O. Brett, J.A.P. Piedade, S.H.P. Serrano (2000) Electroanalysis 12:969-973.
- [63] A.M.O. Brett, V. Diclescu, J.A.P. Piedade (2002) Bioelectrochem. 55:61-62.
- [64] V.C. Diclescu, J.A.P. Piedade, A.M. Oliveira Brett (2007) Bioelectrochem. 70:141-146.
- [65] R.N. Goyal, G. Dryhurst (1982) J. Electroanal. Chem. 135:75-91.
- [66] R.N. Goyal, N. Jain, D.K. Garg (1997) Bioelectrochem. Bioenerg.43:105-114.
- [67] P. Subramanian, G. Dryhurst (1987) J. Electroanal. Chem. 224:137-162.
- [68] K. Frenkel, R.B. Joseph (2002) Carcinogenesis: Role of Reactive Oxygen, Nitrogen Species. Encyclopedia of Cancer. Academic Press, New York.
- [69] C.E. Grey, P. Adlercreutz (2006) Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids 25:259-278.
- [70] N. de los Santos Álvarez, P.M. Ortea, A.M. Pañeda, M.J.L. Castañón, A.J.M. Ordieres, P.T. Blanco (2001) J. Electroanal. Chem. 502:109-117.
- [71] R.N. Goyal, A. Dhawan (2006) Int. J. Electrochem. Sci 1:304-316.
- [72] R.N. Goyal, A. Sangal (2002) J. Electroanal. Chem. 521:72-80.
- [73] R.N. Goyal, A. Sangal (2003) J. Electroanal. Chem. 557:147-155.
- [74] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, S. Stricker (2000) Electroanalysis 12:317-325.
- [75] J. Wang (2000) Nucl. Acids Res. 28:3011-3016.

- [76] M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza (2001) *Fresenius' J. Anal. Chem.* 369:15-22.
- [77] K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, A. Erdem, M. Ozsoz (2001) *Anal. Chim. Acta* 450:45-52.
- [78] A.M.O. Brett, L.A. Silva (2002) *Anal. Bioanal. Chem.* 373:717-723.
- [79] B. Malfoy, J.A. Reynaud (1976) *J. Electroanal. Chem.* 67:359-381.
- [80] B. Malfoy, J.M. Sequaris, P. Valenta, H.W. Nürnberg (1977) *J. Electroanal. Chem.* 75:455-469.
- [81] M.W. Humphreys, R. Parsons (1977) *J. Electroanal. Chem.* 75:427-436.
- [82] H. Kinoshita, S.D. Christian, G. Dryhurst (1977) *J. Electroanal. Chem.* 83:151-166.
- [83] V. Brabec, E. Palecek (1978) *J. Electroanal. Chem.* 88:373-385.
- [84] V. Brabec, M.H. Kim, S.D. Christian, G. Dryhurst (1979) *J. Electroanal. Chem.* 100:111-133.
- [85] J.A. Reynaud (1980) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7:267-280.
- [86] G.C. Barker (1986) *J. Electroanal. Chem.* 214:373-390.
- [87] V. Brabec (1983) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11:245-255.
- [88] A.M.O. Brett, A.-M. Chiorcea (2003) *Electrochem. Comm.* 5:178-183.
- [89] A.M.O. Brett, A.M. Chiorcea-Paquim, V.C. Diculescu, T.S. Oretskaya (2005) *Bioelectrochem.* 67:181-190.
- [90] A.M.O. Brett, A.-M.C. Paquim (2003) *Langmuir* 19:3830-3839.
- [91] A.M.O. Brett, A.-M.C. Paquim (2005) *Bioelectrochem.* 66:117-124.
- [92] A.M.O. Brett, A.M.C. Paquim, V.C. Diculescu, J.A.P. Piedade (2006) *Med. Eng. Phys.* 28:963-970.
- [93] A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira Brett, S.A.a.A. Merkoçi (2007) Procedure 28 Atomic force microscopy characterization of a DNA electrochemical biosensor. *Comprehensive Anal. Chem.*. Elsevier.
- [94] M. Fojta (2002) *Electroanalysis* 14:1449-1463.
- [95] E. Palecek, M. Fojta (2001) *Anal. Chem.* 73:74 A-83 A.

- [96] A.-M. Chiorcea Paquim, A.M. Oliveira Brett (2004) *Bioelectrochem.* 63:229-232.
- [97] A.-M. Chiorcea Paquim, T.S. Oretskaya, A.M. Oliveira Brett (2006) *Electrochim. Acta* 51:5037-5045.
- [98] A.M.O. Brett, M. Vivan, I.R. Fernandes, J.A.P. Piedade (2002) *Talanta* 56:959-970.
- [99] S.O. Kelley, J.K. Barton, N.M. Jackson, L.D. McPherson, A.B. Potter, E.M. Spain, M.J. Allen, M.G. Hill (1998) *Langmuir* 14:6781-6784.
- [100] O. Ikeda, Y. Shiota, T. Sakurai (1990) *J. Electroanal. Chem.* 287:179-184.
- [101] R.E. Kirk, D.F. Othmer (1982) *Platinum-Group Metals. Encyclopedia of Chemical Technology* 3rd ed. Wiley.
- [102] E.C.H. Sykes, L.C. Fernández-Torres, S.U. Nanayakkara, B.A. Mantooth, R.M. Nevin, P.S. Weiss (2005) *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17907-17911.
- [103] L. Wenhua, S. Cansheng, L. Xuejian (2004) *J. Nucl. Mater.* 329-333:1361-1364.
- [104] D. McDonald, L.B. Hunt (1982) *A History of Platinum and its Allied Metals.* J. Matthey (ed). Johnson Matthey & Co, London.
- [105] W.P. Griffith (2003) *Platinum Met. Rev.* 47:175-183.
- [106] T. Davidson, Q. Ke, M. Costa (2007) *Handbook on the Toxicology of Metals* 3rd ed. G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, L.T. Friberg (eds). Elsevier, Amsterdam
- [107] S. Artelt, O. Creutzenberg, H. Kock, K. Levsen, D. Nachtigall, U. Heinrich, T. Rühle, R. Schlögl (1999) *The Science of The Total Environment* 228:219-242.
- [108] B. Sures, W. Steiner, M. Rydlo, H. Taraschewski (1999) *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2574-2579.
- [109] J. Schäfer, D. Hannker, J.D. Eckhardt, D. Stüben (1998) *The Science of The Total Environment* 215:59-67.
- [110] J.G. Camarasa, D. Burrows, T. Menné, J.D. Wilkinson, S. Shaw (1991) *Contact Dermatitis.* 24:370-371.
- [111] WHO (2002) *The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life.*
- [112] S. Zimmermann, C.M. Menzel, D. Stüben, H. Taraschewski, B. Sures (2003) *Environ. Pollut.* 124:1-5.

- [113] H. Satoh, F.N. Gunnar, A.F. Bruce, N. Monica, T.F. Lars (2007) Palladium. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition). Academic Press, Burlington.
- [114] A. Aizman, P.T. Finger, U. Shabto, A. Szechter, A. Berson (2004) Arch. Ophthalmol. 122:1652-1656.
- [115] R.S. Rapaka, K.R. Sorensen, S.D. Lee, R.S. Bhatnagar (1976) Biochim. Biophys Acta (BBA) - Enzymol. 429:63-71.
- [116] M. Monsigny, A.C. Roche, É. Duverger, O. Srinivas, P.K. Johannis (2007) Neoglycoproteins. Comprehensive Glycoscience. Elsevier: Oxford.
- [117] J.G. Duguid, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J.T. Jr. (1993) Biophys. J. 65:1916-1928.
- [118] J.G. Duguid, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J.T. Jr. (1995) Biophys. J. 69:2623-2641.
- [119] (1996) Interactions of metal ions with nucleotides, nucleic acids and their constituents. Metal Ions in Biological Systems. A. Sigel, H. Sigel (eds). Marcel Dekker Inc., New York.
- [120] D.M.L. Goodgame, I. Jeeves, C.D. Reynolds, A.C. Skapski (1975) Nucl. Acids Res. 2:1375-1379.
- [121] T. Theophanides, J. Anastassopoulou, G. Demunno (2003) Metal-Ligand Interactions in Molecular-, Nano-, Macro-Systems in Complex Environments. N. Russo, D.R. Salahub, M. Witko (eds). Kluwer Academic Publishers.
- [122] I.V. Smirnov, F.W. Kotch, I.J. Pickering, J.T. Davis, R.H. Shafer (2002) Biochem. 41:12133-12139.
- [123] C.K.S. Pillai, U.S. Nandi (1977) Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Nucl. Acids, Protein Synth. 474:11-16.
- [124] J. Bünger, J. Stork, K. Stalder (1996) International Archives of Occupational, Environmental Health 69:33-38.
- [125] Y. Uno, M. Morita (1993) Mutation Res.298 269-275.
- [126] IPCS-INCHEM (2002) International Programme on Chemical Safety. Palladium Environmental Health Criteria 226.
- [127] J.G. Duguid, V.A. Bloomfield (1995) Biophys. J.69:2642-2648.
- [128] S. Mansy, B. Rosenberg, A.J. Thomson (1973) J. Am. Chem. Soc. 95:1633-1640.

- [129] T. Gebel, H. Lantzsch, K. Pleßow, H. Dunkelberg (1997) *Mutation Res.* 389:183-190.
- [130] B. Sures, C. Singer, S. Zimmermann (2006) *Biological Effects of Palladium. Palladium Emissions in the Environment.* Springer.
- [131] L. Migliore, G. Frenzilli, C. Nesti, S. Fortaner, E. Sabbioni (2002) *Mutagenesis* 17:411-417.
- [132] J.F.E. Gootzen, P.G.J.M. Peeters, J.M.B. Dukers, L. Lefferts, W. Visscher, J.A.R. van Veen (1997) *J. Electroanal. Chem.* 434:171-183.
- [133] J.F.E. Gootzen, L. Lefferts, J.A.R. van Veen (1999) *Appl. Catal. A: Gen.* 188:127-136.
- [134] N. Kim, M.S. Kwon, C.M. Park, J. Park (2004) *Tetrahedron Lett.* 45:7057-7059.
- [135] R. Pattabiraman (1997) *Appl. Catal. A: Gen.* 153:9-20.
- [136] A. Schmidt, R. Haidar, R. Schomäcker (2005) *Catal. Today* 104:305-312.
- [137] U. Heiz, W.-D. Schneider (2000) *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33:R85-R102.
- [138] M.Z. Atashbar, D. Banerji, S. Singamaneni, V. Bliznyuk (2004) *Nanotech.* 15:374-378.
- [139] K.D. Hill (2002) *Metrologia* 39:51-58.
- [140] F. Edler, M. Kuhne, E. Tegeler (2004) *Metrologia* 41:47-55.
- [141] A. Singhal, R. Mishra, S.K. Kulshreshtha, P.V. Bernhardt, E.R.T. Tiekink (2006) *J. Organomet. Chem.* 691:1402-1410.
- [142] S. Dong, Q. Deng, G. Cheng (1993) *Anal. Chim. Acta* 279:235-240.
- [143] K. Gossner, E. Mizera (1981) *J. Electroanal. Chem.* 125:347-358.
- [144] T. Schalow, B. Brandt, M. Laurin, S. Schauermann, S. Guimond, H. Kühlenbeck, J. Libuda, H.J. Freund (2006) *Surf. Sci.* 600:2528-2542.
- [145] M.H. Shao, T. Huang, P. Liu, J. Zhang, K. Sasaki, M.B. Vukmirovic, R.R. Adzic (2006) *Langmuir* 22:10409-10415.
- [146] G. Erdler, M. Frank, M. Lehmann, H. Reinecke, C. Müller (2006) *Sens. Actuat. A: Phys.* 132:331-336.
- [147] B.S. Harrison, A. Atala (2007) *Biomaterials* 28:344-353.

- [148] P. Kohli, M. Wirtz, C.R. Martin (2004) *Electroanalysis* 16:9-18.
- [149] C. Welch, R. Compton (2006) *Analytical, BioAnal. Chem.* 384:601-619.
- [150] J. Walter, J. Heiermann, G. Dyker, S. Hara, H. Shioyama (2000) *J Catal.* 189:449-455.
- [151] N. Semagina, A. Renken, L. Kiwi-Minsker (2007) *Chem. Eng. Sci.* 62:5344-5348.
- [152] H. Liu, F. Favier, K. Ng, M.P. Zach, R.M. Penner (2001) *Electrochim. Acta* 47:671.
- [153] R.M. Penner (2002) *J. Phys. Chem. B* 106:3339-3353.
- [154] E.C. Walter, B.J. Murray, F. Favier, G. Kaltenpoth, M. Grunze, R.M. Penner (2002) *J. Phys. Chem. B* 106:11407-11411.
- [155] A.-N. Kawde, J. Wang (2004) *Electroanalysis* 16:101-107.
- [156] K.H. Ng, H. Liu, R.M. Penner (2000) *Langmuir* 16:4016-4023.
- [157] J.V. Zoval, J. Lee, S. Gorer, R.M. Penner (1998) *J. Phys. Chem. B* 102:1166-1175.
- [158] R. Narayanan, M.A. El-Sayed (2005) *J. Catal.* 234:348-355.
- [159] O. Corduneanu, V.C. Diculescu, A.-M. Chiorcea-Paquim, A.-M. Oliveira-Brett (2008) *J. Electroanal. Chem.* 624:97-108.
- [160] E. Katz, I. Willner, J. Wang (2004) *Electroanalysis* 16:19-44.
- [161] A.O. Simm, S. Ward-Jones, C.E. Banks, R.G. Compton (2005) *Anal. Sci.* 21:667- 671.
- [162] C.R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka (2003) *J. Electroanal. Chem.* 543:127-133.
- [163] V. Diculescu, A.-M. Chiorcea-Paquim, O. Corduneanu, A.M. Oliveira Brett (2007) *J. Solid State Electrochem.* 11:887-898.
- [164] B. Willner, E. Katz, I. Willner (2006) *Curr. Opinion Biotech.* 17:589-596.
- [165] T. You, O. Niwa, Z. Chen, K. Hayashi, M. Tomita, S. Hirono (2003) *Anal. Chem.* 75:5191.
- [166] C. Xu, G. Wu, Z. Liu, D. Wu, T. Meek, Q. Han (2004) *Matter. Res. Bull.* 39:1499.

- [167] K. Male, S. Hrapovic, Y. Liu, D. Wang, J. Luong (2004) *Anal. Chim. Acta* 516:35.
- [168] Y. Sun, X. Li, J. Cao, W. Zhang, H. Wang (2006) *Adv. Colloid Interfac* 120:47.
- [169] N. Ibl, G. Gut, M. Weber (1973) *Electrochim. Acta* 18:307-314.
- [170] A.J. Arvia, J.C. Canullo, E. Custidiano, C.L. Perdriel, W.E. Triaca (1986) *Electrochim. Acta* 31:1359-1368.
- [171] X.Q. Tong, M. Aindow, J.P.G. Farr (1995) *J. Electroanal. Chem.* 395:117-126.
- [172] V. Badri, A.M. Hermann (2000) *Int. J. Hydrogen Energ.* 25:249-253.
- [173] M. Platt, R.A.W. Dryfe, E.P.L. Roberts (2004) *Electrochim. Acta* 49:3937-3945.
- [174] M.F. Bell, J.A. Harrison (1973) *J. Electroanal. Chem.* 41:15-25.
- [175] B.J.M.F.F.R.M.P. E.C. Walter (2003) *Adv. Materials* 15:396-399.
- [176] X. Ji, C.E. Banks, W. Xi, S.J. Wilkins, R.G. Compton (2006) *J. Phys. Chem. B* 110:22306-22309.
- [177] A. Czerwinski, R. Marassi, S. Zamponi (1991) *J. Electroanal. Chem.* 316:211-221.
- [178] A. Czerwinski, R. Marassi (1992) *J. Electroanal. Chem.* 322:373-381.
- [179] N. Tateishi, K. Yahikozawa, K. Nishimura, M. Suzuki, Y. Iwanaga, M. Watanabe, E. Enami, Y. Matsuda, Y. Takasu (1991) *Electrochim. Acta* 36:1235-1240.
- [180] K.-H. Lubert, M. Guttman, L. Beyer (1996) *Electroanalysis* 8:320-325.
- [181] K.-H. Lubert, M. Guttman, L. Beyer (1999) *J. Electroanal. Chem.* 462:174-180.
- [182] K.-H. Lubert, M. Guttman, L. Beyer, K. Kalcher (2001) *Electrochem. Comm.* 3:102-106.
- [183] C. Batchelor-McAuley, C.E. Banks, A.O. Simm, T.G.J. Jones, R.G. Compton (2006) *Chem. Phys. Chem.* 7:1081-1085.
- [184] L.D. Burke, L.C. Nagle (1999) *J. Electroanal. Chem.* 461:52-64.
- [185] A.E. Bolzan (1995) *J. Electroanal. Chem.* 380:127-138.
- [186] T. Solomun (1988) *J. Electroanal. Chem.* 255:163-177.
- [187] L.D. Burke (1994) *Electrochim. Acta* 39:1841-1848.

- [188] T. Chierchie, C. Mayer, W.J. Lorenz (1982) *J. Electroanal. Chem.* 135:211-220.
- [189] N. Markovic, S. Sarrat, H. Gasteiger, P. Ross (1996) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:3719.
- [190] L.D. Burke, J.K. Casey (1993) *J. Electrochem. Soc.* 140:1284-1291.
- [191] L.D. Burke, J.K. Casey (1993) *J. Electrochem. Soc.* 140:1292-1298.
- [192] L.D. Burke, J.K. Casey (1993) *Journal of Applied Electrochemistry* 23:573-582.
- [193] A.M. Chiorcea-Paquim, O. Corduneanu, S.C.B. Oliveira, V.C. Diculescu, A.M. Oliveira-Brett (2008) *Electrochim. Acta.* In Press, doi:10.1016/j.electacta.2008.07.032.
- [194] S.C.B. Oliveira, O. Corduneanu, A.M.O. Brett (2008) *Bioelectrochem.* 72:53-58.
- [195] B. Desoize (2002) *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 42:1-3.
- [196] B. Desoize (2002) *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 42:213-215.
- [197] E.R.T. Tiekink (2002) *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 42:217-224.
- [198] P. Köpf-Maier (1994) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47:1-16.
- [199] M. Garnett (1995) *J. Inorg. Biochem* 59:231.
- [200] M. Garnett (1998). U.S. Patent No. 5,776,973,
- [201] L. Packer, H.J. Tritschler, K. Wessel (1997) *Free Rad. Biol. Med.* 22:359-378.
- [202] H.S. El-Abhar, M. Shaalan, M. Barakat, E.S. El-Denshary (2002) *J. Pineal Res.* 33:87-94.
- [203] K. Yamamoto, T. Ishikawa, T. Sakabe, T. Taguchi, S. Kawai, M. Marsala (1998) *NeuroReport* 9:1655-1659.
- [204] J.W. Phillis, M.H. O'Regan, S.D. Donard (2002) *Energy utilization in the ischemic/reperfused brain. International Review of Neurobiology.* Academic Press.
- [205] R.M. Sapolsky (1986) *J. Neurosci.* 6:2240-2244.
- [206] M. Garnett (1995). U.S. Patent No. 5,463,093,
- [207] M. Garnett (1997). U.S. Patent No. 5,679,697

- [208] F.J. Antonawich, S.M. Fiore, L.M. Welicky (2004) *Exp. Neurol.* 189:10-15.
- [209] M. Höckel, P. Vaupel (2001) *Seminars in Oncology* 28:36-41.
- [210] G.L. Semenza, D. Artemov, A. Bedi, Z. Bhujwala, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, R. Ravi, J. Simons, P. Taghavi, H. Zhong (2001) *Novartis Found. Symp.* 240:251-260.
- [211] P. Subarsky, R. Hill (2003) *Clinical, Experimental Metastasis* 20:237-250.
- [212] C. Prahalthan, E. Selvakumar, P. Varalakshmi (2005) *Clin. Chim. Acta* 360:160-166.
- [213] V. Morelli, R.J. Zoorob (2000) *Am. Fam. Phys* 62:1051-1060.
- [214] K. Hager, M. Kenklies, J. McAfoose, J. Engel, G. Münch (2007) *Journal of Neural Transmission. Suppl* 72: 189-193.
- [215] M. Morini, L. Roccatagliata, R. Dell'Eva, E. Pedemonte, R. Furlan, S. Minghelli, D. Giunti, U. Pfeffer, M. Marchese, D. Noonan, G. Mancardi, A. Albin, A. Uccelli (2004) *J. Neuroimmunol.* 148:146-153.
- [216] V. Yadav, G. Marracci, J. Lovera, W. Woodward, K. Bogardus, W. Marquardt, L. Shinto, C. Morris, D. Bourdette (2005) *Multiple Sclerosis* 11:159-165.
- [217] G.P. Biewenga, J. Dejong, A. Bast (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 312:114-120.
- [218] C.D. Croce, G. Bronzetti, M. Cini, L. Caltavuturo, G. Poi (2003) *Toxicol. in Vitro* 17:753-759.
- [219] M. Trujillo, L. Folkes, S. Bartesaghi, B. Kalyanaraman, P. Wardman, R. Radi (2005) *Free Rad. Biol. Med.* 39:279-288.
- [220] G.P. Biewenga, G.R.M.M. Haenen, A. Bast (1997) *General Pharmacol.: The Vascular System* 29:315-331.
- [221] O. Corduneanu, M. Garnett, A.M.O. Brett (2007) *Anal. Lett.* 40:1763 - 1778.
- [222] O. Corduneanu, A.-M. Chiorcea-Paquim, M. Garnett, A.M. Oliveira-Brett (2008) *Talanta In Press*, doi:10.1016/j.talanta.2008.10.046.
- [223] R.D. Hubbard, S. Fidanze, B.T. John, J.T. David (2007) *Alkylating, Platinum Antitumor Compounds. Comprehensive Medicinal Chemistry II.* Elsevier, Oxford.
- [224] B. Rosenberg, L. Vancamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour (1969) *Nature* 222:385-386.

- [225] A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson (**1992**) *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3070-3074.
- [226] S. Aebi, B. Kurdi-Haidar, R. Gordon, B. Cenni, H. Zheng, D. Fink, R.D. Christen, C.R. Boland, M. Koi, R. Fishel, S.B. Howell (**1996**) *Cancer Res.* 56:3087-3090.
- [227] G. Natile, M. Coluccia (**2001**) *Coord. Chem. Rev.* 216-217:383-410.
- [228] J.M. Pérez, M.A. Fuertes, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger (**2000**) *Critical Rev. Oncol./Hematol.*35:109-120.
- [229] A.G. Quiroga, C. Navarro Ranninger (**2004**) *Coord. Chem. Rev.* 248:119-133.
- [230] C. Avendaño, J.C. Menéndez (**2008**) *DNA Alkylating Agents. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* Elsevier, Amsterdam.
- [231] Z. Guo, L.F. Cooper (**2000**) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270:183-189.
- [232] C. Navarro-Ranninger, F. Zamora, I. López-Solera, J.R. Masaguer, J.M. Pérez, C. Alonso, S. Martínez-Carrera (**1992**) *J. Inorg. Biochem.* 46:267-279.
- [233] C. Navarro-Ranninger, F. Zamora, J.R. Masaguer, J.M. Pérez, V.M. González, C. Alonso (**1993**) *J. Inorg. Biochem.* 52:37-49.
- [234] J.M. Pérez, E.I. Montero, A.G. Quiroga, M.A. Fuerte, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger (**2001**) *Metal Based Drugs.* 8 29-37.
- [235] N.J. Wheate, J.G. Collins (**2003**) *Coord. Chem. Rev.* 241:133-145.
- [236] N. Farrell (**2004**) *Polynuclear platinum drugs. Metal Ions in Biological Systems-Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents*
A. Sigel, H. Sigel (eds). Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
- [237] B. Moriarity, O. Nováková, N. Farrell, V. Brabec, J. Kaspáková (**2007**) *Arch. Biochem. Biophys.* 459:264-272.
- [238] V. Brabec, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, J.W. Cox, Y. Qu, N. Farrell (**1999**) *Biochemistry* 38:6781-6790.
- [239] J. Kasparkova, O. Novakova, O. Vrana, N. Farrell, V. Brabec (**1999**) *Biochemistry* 38:10997-11005.
- [240] J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec (**2000**) *J. Biol. Chem.* 275:15789-15798.
- [241] J. Kasparkova, J. Zehnulova, N. Farrell, V. Brabec (**2002**) *J. Biol. Chem.* 277:48076-48086.

- [242] R.D. Graham, D.R. Williams (1979) *J. Inorg. Nucl. Chem.* 41:1245-1249.
- [243] M.M.L. Fiallo, A. Garnier-Suillerot (1990) *Inorganic Chemistry* 29:893-897.
- [244] L.J. Teixeira, M. Seabra, E. Reis, M.T. Girao da Cruz, M.C. Pedroso de Lima, E. Pereira, M.A. Miranda, M.P.M. Marques (2004) *J. Med. Chem.* 47:2917-2925.
- [245] S.M. Fiuza, A.M. Amado, P.J. Oliveira, V.A. Sardao, L.A.E.B. de Carvalho, M.P.M. Marques (2006) *Lett. Drug Desig. Discov.* 3:149-151.
- [246] M.P.M. Marques, T. Girão, M.C. Pedroso De Lima, A. Gameiro, E. Pereira, P. Garcia (2002) *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1589:63-70.
- [247] O. Corduneanu, M.P.M. Marques, A.M.O. Brett em preparação.
- [248] (1988) *Dorland's Medical Dictionary* 27th ed. WB Saunders, Philadelphia
- [249] L.J. Reed, B.G. De Busk, I.C. Gunsalus, C.S. Hornberger Jr. (1951) *Science* 114:93-95.
- [250] G. Spoto, S. Dupre, D. Cavallin (1982) *IRCS Med.Sci.* 10:626.
- [251] R.M. Cicchillo, D.F. Iwig, A.D. Jones, N.M. Nesbitt, C. Baleanu-Gogonea, M.G. Souder, L. Tu, S.J. Booker (2004) *Biochemistry* 43:6378-6386.
- [252] J. Bustamante, J.K. Lodge, L. Marcocci, H.J. Tritschler, L. Packer, B.H. Rihn (1998) *Free Rad. Biol. Med.* 24:1023-1039.
- [253] A.L. Lehninger (1970) *Biochemistry; the molecular basis of cell structure, function* 1st ed. Worth Publishers, New York.
- [254] E.L. Patterson, J.A. Brockman, F.P. Day, J.V. Pierce, M.E. Macchi, C.E. Hoffman, C.T.O. Fong, E.L.R. Stokstad, T.H. Jukes (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73:5919-5920.
- [255] L.J. Reed, I.C. Gunsalus, G.H.F. Schnakenberg, Q.F. Soper, H.E. Boaz, S.F. Kern, T.V. Parke (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75:1267-1270.
- [256] F.E. Stary, S.L. Jindal, R.W. Murray (1975) *J. Org. Chem.* 40:58-62.
- [257] Y. Li, Y. Zhao, W. Yu, S. Jiang (2004) *Food Chem.* 84:563-567.
- [258] G.R.M.M. Haenen, A. Bast (1991) *Biochem. Pharmacol.* 42:2244-2246.
- [259] F. Navari-Izzo, M.F. Quartacci, C. Sgherri (2002) *Plant Physiol. Biochem.* 40:463-470.

- [260] M.R. Baumgartner, H. Schmalle, E. Dubler (1996) *Inorg. Chim. Acta* 252:319-331.
- [261] J.K. Lodge, M.G. Traber, L. Packer (1998) *Free Rad. Biol. Med.* 25:287-297.
- [262] G. Hande, O. Hilal, O. Serdar, E. Nuran (1999) *Free Rad. Biol. Med.* 27:75-81.
- [263] A.V. Kozlov, L. Gille, K. Staniek, H. Nohl (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 363:148-154.
- [264] H. Moini, L. Packer, N.-E.L. Saris (2002) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182:84-90.
- [265] U. Çakatay, R. Kayall, A. Sivas, F. Tekeli (2005) *Arch. Gerontol. Geriatr.* 40:231-240.
- [266] N. Perricone, K. Nagy, F. Horváth, G. Dajkó, I. Uray, I. Zs.-Nagy (1999) *Arch. Gerontol. Geriatr.* 29:45-56.
- [267] G.H. Marracci, R.E. Jones, G.P. McKeon, D.N. Bourdette (2002) *J. Neuroimmunol.* 131:104-114.
- [268] L. Lodge, G.J. Handelman, T. Konishi, S. Matsugo, V.V. Mathur, L. Packer (1997) *J. Appl. Nutr.* 49 3-11.
- [269] R. Hermann, G. Niebch, H.O. Borbe, H. Fieger-Büschges, P. Ruus, H. Nowak, H. Riethmüller-Winzen, M. Peukert, H. Blume (1996) *Eur. J. Pharm. Sci.* 4:167-174.
- [270] A.R. Smith, S.V. Shenvi, M. Widlansky, J.H. Suh, T.M. Hagen (2004) *Curr. Med. Chem.* 11:1135-1146.
- [271] J. Teichert, R. Hermann, P. Ruus, R. Preiss (2003) *J. Clin. Pharmacol.* 43:1257-1267.
- [272] A.A. Herbert, J.R. Guest (1975) *Arch. Microbiol.* 106:259-266.
- [273] C.L. Garganta, B. Wolf (1996) *Anal. Biochem.* 240:177-184.
- [274] A. Sitton, M.G. Schmid, G. Gübitz, H.Y. Aboul-Enein (2004) *J. Biochem. Biophys. Met.* 61:119-124.
- [275] H. Kataoka, N. Hirabayashi, M. Makita (1993) *J. Chromatog: Biomed. Appl.* 615:197-202.
- [276] J. Teichert, R. Preiß (1995) *J. Chromatog. B: Biomed. Sci. Appl.* 672:277-281.
- [277] G.T. Rogers, D.N. Mallett (1983) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 10:269-277.
- [278] K. Sugawara, S. Tanaka, K. Hasebe, M. Taga (1993) *J. Electroanal. Chem.* 347:393-398.

- [279] S. Chevion, M. Hofmann, R. Ziegler, M. Chevion, P.P. Nawroth (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41:317-327.
- [280] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion (2000) *Free Rad. Biol. Med.* 28:860-870.
- [281] D.T. Burns, K. Danzer, A. Townshend (2002) *Pure Appl. Chem.* 74: 2201-2205.
- [282] T. Nagatsu (1991) *J. Chromatog. B: Biomed. Sci. Appl.* 566:287-307.
- [283] R. Maijala, S. Eerola, R. Hubert (2002) *Biogenic Amines. Encyclopedia of Dairy Sciences.* Elsevier, Oxford.
- [284] F.A. Carey (2003) *Organic Chemistry*, 5th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- [285] T.J. Thomas, V.A. Bloomfield (1984) *Biopolymers* 23:1295-1306.
- [286] A.K. Abraham, A. Pihl (1981) *Trends Biochem. Sci.* 6:106-107.
- [287] M. Behe, G. Felsenfeld (1981) *P. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1619-1623.
- [288] H. Deng, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J.T. Jr (2000) *Nucl. Acids Res.* 28:3379-3385.
- [289] B.G. Feuerstein, N. Pattabiraman, L.J. Marton (1986) *P. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5948-5952.
- [290] K. Tomita, T. Hakoshima, K. Inubushi, S. Kunisawa, H. Ohishi, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, A.H.J. Wang, A. Rich (1989) *J. Molec. Graph.* 7:71-75.
- [291] J.C. Murphy (1999) *Nature Biotechnol.* 17:822 - 823
- [292] D.H. Russell (1971) *Nature New Biol.* 233:144-145.
- [293] D.H. Russell, C.C. Levy, S.C. Schimpff, I.A. Hawk (1971) *Cancer Res.* 31:1555-1558.
- [294] M.D. Milne, A.M. Asatoor, K.D.G. Edwards, L.W. Loughridge (1961) *Gut* 2:323-337.
- [295] H.J. Bremer, E. Kohne, W. Endres (1971) *Clin. Chim. Acta* 32:407-418.
- [296] T.L. Perry, W.A. Schroeder (1963) *J. Chromatogr.* 12:358-373.
- [297] T.L. Perry, S. Hansen, L. Macdougall (1967) *Nature* 214:484-485.
- [298] R. Chayen (1984) *Cell Biochem. Function* 2:15-20.

- [299] C. Dobell (1960) Antony van Leeuwenhoek and His "Little Animals". Dover Publications, Inc., New York.
- [300] D.H. Russell, B.G.M. Durie, S.E. Salmon (1975) *Lancet* 2:797-799.
- [301] B.G.M. Durie, S.E. Salmon, D.H. Russell (1977) *Cancer Res.* 37:214-221.
- [302] A. Toninello, P. Pietrangeli, U. De Marchi, M. Salvi, B. Mondovì (2006) *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1765:1-13.
- [303] J.C. Allen (1983) *Cell Biochem. Function* 1:131-140.
- [304] S. Bienz, R. Detterbeck, C. Ensch, A. Guggisberg, U. Hausermann, C. Meisterhans, B. Wendt, C. Werner, M. Hesse (2002) *Putrescine, Spermidine, Spermine and Related Polyamine Alkaloids. The Alkaloids.* Elsevier.
- [305] N. Seiler, J.G. Delcros, J.P. Moulinoux (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:843-861.
- [306] J. Price, P. Metz, H. Veening (1987) *Chromatographia* 24:795-799.
- [307] A.A. Hawi, H. Yip, T.S. Sullivan, G.A. Digenis (1988) *Anal. Biochem.* 172:235-240.
- [308] M. Yang, S.A. Tomellini (1999) *J. Chromatogr. A* 841:9-18.
- [309] R.C. Simpson, H.Y. Mohammed, H. Veening (1982) *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 5:245 - 264.
- [310] M.C. Vidal-Carou, F. Lahoz-Portolés, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font (2003) *J. Chromatogr. A* 998:235-241.
- [311] C. Bayle, V. Poinso, C. Fournier-Noël, F. Couderc (2006) *Laser-Induced Fluorescence Detection: A Summary. Electrokinetic Chromatography.* P. Ute (ed). John Wiley & Sons, Ltd.
- [312] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram (2003) *Biosystems Eng.* 84:1-12.
- [313] S. Jolley, M. Koppang, T. Jackson, G.M. Swain (1997) *Anal. Chem.* 69:4099-4107.
- [314] M.D. Koppang, M. Witek, J. Blau, G.M. Swain (1999) *Anal. Chem.* 71:1188-1195.
- [315] M.A. Witek, G.M. Swain (2001) *Anal. Chim. Acta* 440:119-129.
- [316] I.G. Casella, S.R.E. Desimoni (1998) *Electroanalysis* 10:1005-1009.

- [317] O. Corduneanu, M.P.M. Marques, A.M.O. Brett em preparação.
- [318] A.M.O. Brett, C.M.A. Brett (1993) *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press.
- [319] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett (1998) *Electroanalysis*. Oxford University Press.
- [320] P.T. Kissinger, W.R. Heineman (1996) *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker, Inc.
- [321] J.A.V. Butler (1924) *Trans. Faraday Soc.* 19:729-733.
- [322] J.A.V. Butler (1924) *Trans. Faraday Soc.* 19:734-739.
- [323] IUPAC (1997) *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). A.D. McNaught, A. Wilkinson (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [324] D.T. Fagan, I.F. Hu, T. Kuwana (1985) *Anal. Chem.* 57:2759-2763.
- [325] N.M. Pontikos, R.L. McCreery (1992) *J. Electroanal. Chem.* 324:229-242.
- [326] D.D. MacDonald (1977) *Transient Techniques in Electrochemistry* 1st ed. Plenum Press, New York.
- [327] V.D. Parker (1986) Chapter 3 Linear Sweep, Cyclic Voltammetry. *Comprehensive Chemical Kinetics*. C.H. Bamford, R.G. Compton (eds). Elsevier.
- [328] P. Kissinger, W.R. Heineman (1983) *Journal of Chemical Education* 60:702-706.
- [329] V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M.O. Brett (2006) *Electroanalysis* 18:1808-1814.
- [330] J.G. Osteryoung, R.A. Osteryoung (1985) *Anal. Chem.* 57 101A-110A.
- [331] HBCP Handbook of Chemistry and Physics <http://www.hbcpnetbase.com>.