

Isabel Patrícia Garrido Fernandes

Mecanismos redox e eletroanálise de fármacos: temozolomida, clioquinol, daidzeína e azo-derivados da isatina

Mestrado em Química
Departamento de Química

FCTUC

junho 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Isabel Patrícia Garrido Fernandes

**MECANISMOS REDOX E ELETROANÁLISE DE
FÁRMACOS: TEMOZOLOMIDA, CLIOQUINOL,
DAIDZEÍNA E AZO-DERIVADOS DA ISATINA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,
área de especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett

junho 2012

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett, os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e pela confiança manifestada, ao conceder-me a oportunidade de trabalhar no seu grupo de investigação. Os seus conselhos, incentivos e orientação científica foram fundamentais na realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto Pedro Nunes as bolsas concedidas no âmbito dos projetos PTDC/QUI/65255/2006 e PTDC/SAU-BEB/104643/2008 financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Ao Doutor Carlos Oliveira agradeço de modo especial por partilhar desde o início a sua vasta experiência científica. Graças à sua ajuda constante e aos seus preciosos ensinamentos tudo se tornou mais fácil.

Aos meus amigos e colegas do Instituto Pedro Nunes especialmente à Dora, Ana-Maria, Victor, Inês, Oana, Adrian, Paulina e Ilanna, pela amizade, pelos momentos de companheirismo e por estarem sempre disponíveis quando necessário.

A toda a minha família de um modo muito especial, à minha mãe, à minha tia e ao meu marido, Serge Nunes, desejo agradecer toda a ajuda, o carinho, a compreensão e o apoio constantes.

A todos aqueles que de algum modo me ajudaram a concluir mais uma etapa do meu percurso profissional.

Muito obrigada a todos!

Índice

Abreviaturas/Abbreviations.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Capítulo 1 Introdução	1
1.1. Introdução	2
1.2. Compostos Triazenos - Temozolomida.....	3
1.2.1. Mecanismos de Ativação e Ação da TMZ.....	5
1.2.2. Métodos de detecção e quantificação da TMZ	6
1.3. Compostos Aromáticos	7
1.3.1. Fenóis 7	
1.3.1.1. Daidzeína	11
1.3.1.2. Clioquinol	15
1.3.2. Indóis: Isatina e derivados azotados	18
1.4. Princípios da eletroquímica	22
1.4.1. Voltametria cíclica (CV).....	26
1.4.2. Voltametria de impulso diferencial (DPV)	29
1.4.3. Voltametria de onda quadrada (SWV).....	31
Capítulo 2 Experimental	34
2.1. Reagentes e soluções.....	35
2.2. Instrumentação	37
2.2.1. Experiências Eletroquímicas	37
2.2.2. Espetrofotometria de UV - Vis.....	39
Capítulo 3 Estudo voltamétrico da TMZ.....	40
3.1. Estudo eletroquímico da Temozolomida.....	41
3.2. Redução eletroquímica	44
3.2.1. Voltametria cíclica.....	44
3.2.2. Voltametria de impulso diferencial; Influência do pH	46
3.3. Oxidação eletroquímica.....	48

3.3.1.	Voltametria cíclica.....	48
3.3.2.	Voltametria de onda quadrada.....	48
3.3.3.	Voltametria de impulso diferencial; Influência do pH.....	50
3.4.	Determinação eletroanalítica da TMZ.....	54
Capítulo 4	Estudo da oxidação dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM.....	56
4.1.	Estudo do comportamento anódico da DZ e da 7-OH-4-CHM.....	58
4.1.1.	Voltametria cíclica.....	58
4.1.2.	Voltametria de Impulso Diferencial. Influência do pH.....	61
4.1.3.	Mecanismo de oxidação da DZ e da 7-OH-4-CHM.....	66
4.1.4.	Determinação analítica.....	67
4.1.5.	Determinação dos valores de pK_a por espectrofotometria de UV-vis..	69
Capítulo 5	Estudo da oxidação do CQ.....	72
5.1.	Estudo do comportamento anódico do Clioquinol.....	74
5.1.1.	Voltametria cíclica.....	74
5.1.2.	Voltametria de Onda Quadrada.....	75
5.1.3.	Voltametria de impulso diferencial de derivados fenólicos.....	76
5.1.4.	Voltametria de impulso diferencial do CQ; Influência do pH.....	79
5.1.5.	Capacidade quelante do CQ.....	83
Capítulo 6	Estudo Redox de um Grupo de Azo-Derivados da Isatina.....	85
6.1.	Estudo do comportamento redox de derivados da isatina.....	86
6.2.	Oxidação eletroquímica.....	87
6.2.1	Voltametria cíclica.....	87
6.2.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH.....	94
6.2.3	Voltametria de onda quadrada.....	98
6.2.4	Mecanismos de oxidação.....	101
6.3.	Redução eletroquímica.....	107
6.3.1	Voltametria cíclica.....	107
6.3.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH.....	108
Capítulo 7	Conclusões.....	114
Capítulo 8	Bibliografia.....	119

Abreviaturas

7-OH-4-CHM	7-hidroxi-4-cromona
AIC	5(4)-aminoimidazole-4(5)-carboxamida
CQ	Clioquinol
¹³C RMN	Ressonância magnética nuclear
CV	Voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DPV	Voltametria de impulso diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
DTIC	Dacarbazida
DZ	Daidzeína
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo (<i>Glassy Carbon Electrode</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão /High Pressure Liquid Chromatography)
ISA	Isatina
MAO	Monoamina oxidase endógena
MTIC	5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazo-4-carboxamida
MZ	Mitozolomida
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Radicais reativos de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
TMZ	Temozolomida
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento redox de compostos farmacêuticos, nomeadamente a temozolomida (TMZ), o clioquinol (CQ), a daidzeína (DZ) e de um grupo de compostos azotados derivados da isatina (ISA), todos com diferentes aplicações farmacoterapêuticas, entre as quais antineoplásicas, antifúngicas e antioxidantes, utilizando um elétrodo de carbono vítreo (GCE) e os métodos voltamétricos de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada.

O mecanismo de redução da TMZ é um processo controlado por difusão, irreversível, dependente do pH e ocorre numa única etapa com a transferência de um eletrão e de um próton. Enquanto o seu mecanismo de oxidação é um processo controlado por adsorção, irreversível, dependente do pH e ocorre em duas etapas com a formação de um produto eletroativo.

A oxidação da DZ ocorre em duas etapas, ambas dependentes do pH e irreversíveis e que estão associadas à oxidação dos grupos fenólicos (4'-OH) e (7-OH) da molécula de DZ. O mecanismo anódico da DZ foi comparado com o de uma molécula de estrutura semelhante à DZ mas sem o grupo (4'-OH), a 7-hidroxi-4-cromona (7-OH-4-CHM). A oxidação da 7-OH-4-CHM também é irreversível e dependente do pH mas ocorre numa única etapa.

A oxidação do CQ é um processo controlado por adsorção, irreversível, dependente do pH e ocorre numa única etapa com a transferência de um eletrão e de um próton e com a formação de um produto eletroativo que sofre oxidação reversível.

Os compostos azotados derivados da isatina apresentaram mecanismos de oxidação e redução distintos e característicos de cada um dos grupos funcionais hidrazona, semicarbazona e nitro, ligados à estrutura anelar da ISA, em comparação com o comportamento eletroquímico da ISA.

O comportamento redox para cada um dos diferentes fármacos foi esclarecido, os mecanismos redox foram propostos, foram determinados os valores dos coeficientes de difusão e pKa, e propostos métodos eletroanalíticos para a quantificação em fluidos biológicos para o grupo de fármacos investigados.

Abstract

The aim of this work was to investigate, at a glassy carbon electrode (GCE) surface, using cyclic, square-wave and different pulse voltammetry, the redox behaviour of different pharmaceuticals compounds, such as temozolomide (TMZ), clioquinol (CQ), daidzein (DZ) and a group of isatin nitro-derivatives (ISA), all with different pharmacotherapeutics applications, including antineoplastic, antifungal and antioxidants.

The reduction mechanism of TMZ is a diffusion-controlled, irreversible, pH dependent process that occurs in a single step with the transfer of one electron and one proton. The TMZ oxidation mechanism is an adsorption-controlled, irreversible, pH dependent process and occurs in two steps with the formation of an electroactive product.

The oxidation of DZ occurs in two steps, both pH dependent and irreversible, and is associated with the oxidation of the phenolic groups of the DZ molecule, (4'-OH) and (7-OH). The DZ anodic mechanism was compared with the one of a similar molecule, 7-hydroxy-4-chromone (7-OH-4-CHM), but without the phenolic group (4'-OH). The 7-OH-4-CHM oxidation is also irreversible and pH dependent and occurs in a single step.

CQ oxidation is an adsorption-controlled, irreversible, pH dependent process and occurs in a single step with the transfer of one electron and one proton and with the formation of an electroactive product that undergoes reversible oxidation.

The isatin nitro-derivative compounds presented distinct and characteristic oxidation and reduction mechanisms for each one of the functional groups connected to the ISA ring, hydrazone, semicarbazone and nitro, when compared with the ISA electrochemical behaviour.

For each one of the different pharmaceuticals compounds, the redox behaviour was clarified, the redox mechanisms were proposed, the values of diffusion coefficients and pKa were determined and electroanalytical methods for the quantification in biological fluids were proposed.

Capítulo 1

Introdução

1.1. Introdução

Uma molécula para ter interesse farmacêutico deve possuir determinadas características que lhe permitam ligar-se ao seu alvo e atingir o efeito desejado. Além disso, muitos outros fatores também devem ser levados em consideração, entre eles, a atividade da molécula *in vivo*, a estereoquímica, difusão, solubilidade, metabolismo e as reações redox envolvidas nos processos fisiológicos. A utilização dos métodos eletroquímicos tem colaborado significativamente na caracterização de compostos farmacêuticos e de moléculas bioativas, com a importante vantagem de possibilitar o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos a partir desses conhecimentos. A investigação dos processos de transferência de elétrons em reações biológicas, fornecida por dados eletroquímicos correlacionados com a estrutura-atividade da molécula, fornece informações úteis relativamente aos mecanismos dos compostos nas células vivas [1-4].

A eletroanálise é também uma área relevante, uma vez que permite determinações quantitativas de analitos, diretamente na amostra, sem necessidade de tratamento ou separação química, em situações em que os efeitos de matriz são mínimos. Além disso os métodos voltamétricos permitem a determinação e detecção rápida e simultânea de compostos farmacêuticos, com custos reduzidos e evitando o uso de solventes orgânicos, aspectos muito importantes atualmente em qualquer análise [5].

O trabalho desenvolvido insere-se neste contexto, na medida em que foi investigado o comportamento redox e os respectivos mecanismos de oxidação e redução de compostos farmacêuticos com diferentes aplicações clínicas, utilizando um elétrodo de carbono vítreo (GCE). Deste modo serão apresentados e discutidos os resultados do comportamento redox de: um composto triazeno, temozolomida [6], dos compostos

aromáticos, a daidzeína [7] e o clioquinol [8], e um conjunto de derivados da isatina que possuem na sua estrutura grupos funcionais azotados [9].

1.2. Compostos Triazenos - Temozolomida

Grande parte dos compostos farmacêuticos antitumorais disponíveis no mercado caracterizam-se pela interação com o DNA ou com os seus precursores, de modo a inibir a replicação celular ou provocando lesões irreparáveis na cadeia [10]. As substâncias capazes de clivar e induzir a morte celular das células neoplásicas são muito importantes, devido à sua eficiência terapêutica [11].

Os compostos triazenos, que contêm na sua estrutura principal uma cadeia aberta com três átomos de nitrogénio interligados em sequência (N=NN) - grupo diazoamina - caracterizam-se por serem um grupo de agentes alquilantes com um perfil farmacológico muito variado e comprovado, e um exemplo de moléculas capazes de interagir com o DNA, devido às suas propriedades antineoplásicas. Estes compostos são alvo de muitas pesquisas científicas, uma vez que alterando a sua estrutura química, os derivados podem adquirir diferentes propriedades, entre elas: atividade antimicrobiana, antifúngica, mutagénica, carcinogénica e teratogénica [12]. O grupo diazoamina é responsável pelas propriedades químicas, físicas e antitumorais destas moléculas [13].

Entre os vários compostos triazenos que existem, há um grupo específico de agentes sintéticos do qual fazem parte a dacarbazina (DTIC), a temozolomida (TMZ) e a mitozolomida (MZ), **Fig. 1.1.**, dos quais apenas a DTIC e a TMZ são utilizados para o tratamento clínico de melanomas, linfomas, sarcomas, tumores cerebrais primários e metastáticos [14,15].

O primeiro composto desta classe a apresentar propriedades antitumorais foi a DTIC mas, devido aos efeitos tóxicos hematológicos que surgiram, a sua comercialização foi interrompida [16]. Em alternativa surgiu a TMZ, um composto análogo da MZ, com estrutura e funções relacionadas com a DTIC. Trata-se de um agente alquilante monofuncional da classe das imidotetrazinas, sintetizado por Malcom Stevens em 1984 [17], que demonstrou atividade antitumoral com um nível de toxicidade muito mais baixo nos ensaios pré-clínicos relativamente à DTIC e que não apresentou dificuldades em atravessar os diferentes tecidos do organismo, incluindo os do cérebro.

A TMZ é uma molécula de baixo peso molecular que após ingestão oral é totalmente absorvida e, após 8h de ingestão, é completamente eliminada e por este motivo representa um risco reduzido de toxicidade para a medula óssea.

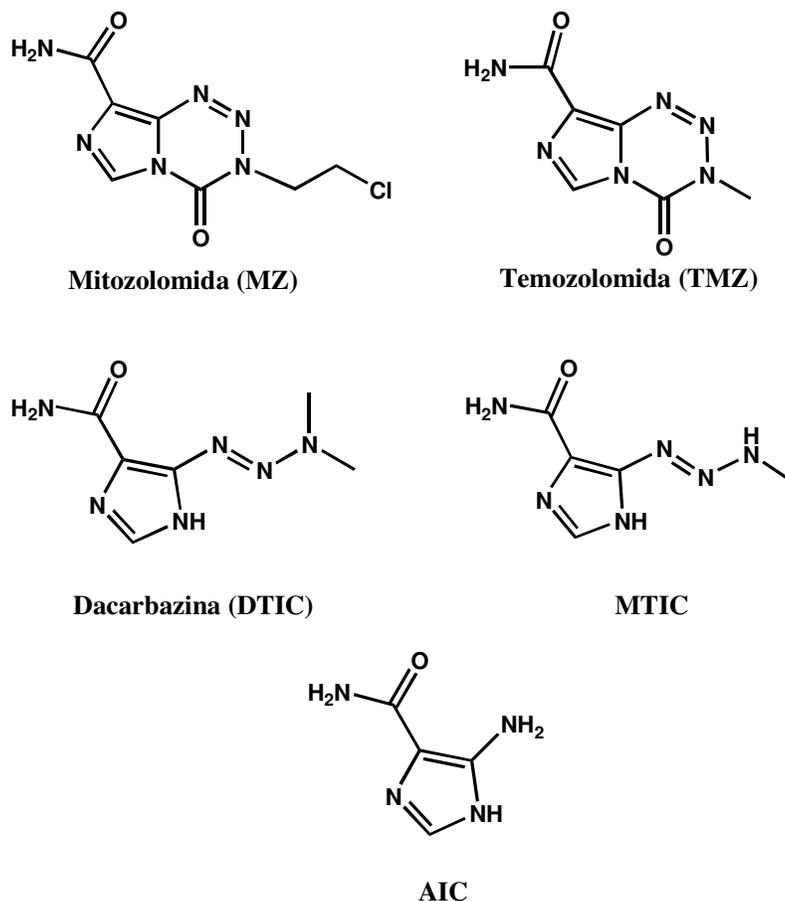


Figura 1.1 Estruturas químicas da mitozolomida (MZ), temozolomida (TMZ), dacarbazina (DTIC), MTIC e AIC.

Além de ser utilizada no tratamento de tumores cerebrais e melanomas metastáticos, alguns estudos recentes apresentaram bons resultados para o tratamento da leucemia aguda refratária ou recorrente [18]. A TMZ é um medicamento antineoplásico utilizado nas situações em que a cirurgia ou a radioterapia não são possíveis ou são ineficazes, ou como adjuvante da cirurgia ou da radioterapia como tratamento inicial. Este medicamento pode ser utilizado como atenuante dos sintomas ou como meio de prolongar a vida do paciente [19].

1.2.1. Mecanismos de Ativação e Ação da TMZ

Após a ingestão, a TMZ é convertida no seu metabolito ativo, sem necessidade de desmetilação enzimática por hidrólise no fígado [16,20]. Depois de adsorvida no intestino, o átomo eletropositivo C4 da TMZ sofre um ataque nucleofílico por parte da água e dá-se a abertura do anel heterocíclico formando-se a MTIC e dióxido de carbono. De seguida, a MTIC degrada-se rapidamente a AIC (derivado inativo) e ao catião metildiazônio (ião eletrofílico altamente reativo) num processo de conversão irreversível dependente do pH, **Fig. 1.1 e 1.2**.

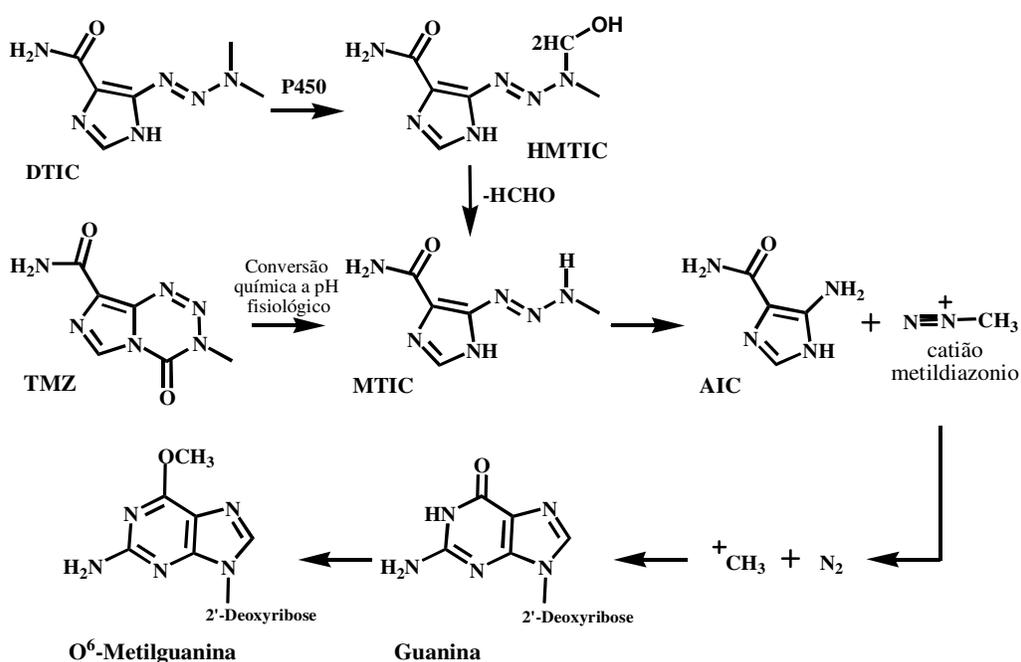


Figura 1.2 Ativação e mecanismo de ação da DTIC e da TMZ. A ativação da DTIC depende do citocromo P450 enquanto a ativação da TMZ ocorre espontaneamente em meio aquoso a pH fisiológico sem intervenção hepática (adaptado de [15]).

Quando dissolvida em soluções tampão aquosas a TMZ é estável a pH < 4,0, mas rapidamente sofre hidrólise para MTIC a pH > 7,0. Por outro lado, a MTIC é estável a pHs alcalinos, mas a pH < 7,0 rapidamente se converte em AIC [21,15]. É de salientar que, uma vez que é ativada espontaneamente em solução aquosa a TMZ pode ser usado em terapia local. Além disso, como já foi referido, a molécula atravessa a

barreira hematoencefálica sem dificuldade, sendo ativada apenas no compartimento cerebral, o que faz com que lhe sejam atribuídas algumas propriedades farmacocinéticas vantajosas contra determinados tipos de tumores cerebrais.

O mecanismo de ação deste composto consiste na indução de alterações do DNA que interfere com a replicação celular, **Fig. 1.2**.

A interação final do agente com o DNA consiste na transformação da base guanina através da metilação nas posições N7-guanina, O6-guanina e O3-adenina do DNA. Apesar da TMZ formar muito poucos aductos de O6-metilguanina, cerca de 8% contra 65-80% de aductos de N7-metilguanina, os mesmos são os principais responsáveis pelos efeitos citotóxicos/mutagénicos do composto, **Fig. 1.2** [15].

A TMZ exerce a sua ação através da inibição da síntese de DNA, RNA e de proteínas, sem ocorrer a ligação cruzada (“*cross-linking*”) das cadeias do DNA. No entanto, o mecanismo exato da ação da TMZ não está ainda bem definido [15].

1.2.2. Métodos de deteção e quantificação da TMZ

A deteção e quantificação da TMZ em fluidos biológicos é um aspecto importante uma vez que se admite que a TMZ exerce a sua atividade antitumoral através do seu produto de degradação ativo, a MTIC. A TMZ é quimicamente convertida em MTIC dependendo do pH do meio e completamente adsorvida a partir do trato gastrointestinal, após ingestão oral, atingindo rapidamente as concentrações máximas no plasma (30-90 min). Para avaliar as características farmacocinéticas deste compostos são necessárias técnicas suficientemente rápidas e procedimentos analíticos adequados com o objetivo de determinar as respetivas concentrações e garantir a sua estabilidade no plasma.

Existem estudos relativos ao desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com deteção UV que apresentam resultados muito satisfatórios relativamente à estabilidade e à determinação analítica da TMZ no plasma [22-25]. Foram desenvolvidos outros métodos para avaliar as características farmacocinéticas, entre os quais a ressonância magnética nuclear (¹³C RMN), um método não evasivo, que permite monitorizar a quantidade de TMZ presente no cérebro durante a terapia e facilitar a otimização do plano de tratamento [26,27].

No entanto, é importante o desenvolvimento de métodos mais acessíveis em termos de custos e mais ecológicos, uma vez que os métodos normalmente usados acarretam custos elevados, não só relativamente aos dispositivos utilizados como também ao elevado número de solventes orgânicos que utilizam nas medições. O estudo desenvolvido foi igualmente relevante uma vez que na literatura, não existiam estudos relacionados com o comportamento eletroquímico da TMZ num GCE, nem nenhum método eletroanalítico para a sua quantificação.

1.3. Compostos Aromáticos

Os compostos aromáticos são uma grande classe de compostos orgânicos não saturados que contêm um anel de benzeno nas suas moléculas ou que possuem propriedades químicas idênticas às do benzeno. Estes compostos apresentam uma vasta gama de propriedades biológicas e farmacológicas entre as quais propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais e antioxidantes.

Neste trabalho estudou-se o comportamento redox de alguns fármacos aromáticos que pertencem a classes distintas. A daidzeína e o clioquinol são compostos aromáticos que pertencem à subclasse dos fenóis, pois possuem na sua estrutura a molécula do fenol. O grupo de derivados da isatina são compostos aromáticos mas que pertencem à subclasse dos indóis, uma vez que na sua estrutura principal possuem a molécula do indol.

1.3.1. Fenóis

Os compostos fenólicos fazem parte de um grande grupo de metabolitos secundários das plantas e da maioria dos produtos naturais, principalmente das frutas e vegetais, contribuindo para o seu sabor e cor [28]. São moléculas muito reativas e, por esse motivo, são frequentemente utilizados em processos de síntese orgânica, na indústria farmacêutica e também na indústria alimentar, com a finalidade de preservar os alimentos, impedindo a proliferação dos micro-organismos [29,30]. Os compostos farmacêuticos desenvolvidos a partir destas moléculas apresentam um grande número de propriedades biológicas importantes destacando-se as propriedades anti-

inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, anticonvulsivas e antioxidantes [31-37]. Atualmente tem-se verificado um interesse acrescido neste tipo de compostos de origem natural devido às suas características farmacoterapêuticas.

Os compostos fenólicos são moléculas que têm um ou mais grupos hidroxilo (-OH) ligados diretamente a um anel aromático. O fenol, **Fig. 1.3**, é a estrutura base desta classe de moléculas.

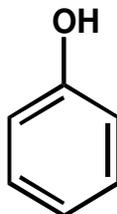


Figura 1.3 Estrutura química do fenol.

As moléculas que possuem na sua estrutura este grupo funcional possuem diversas aplicações indispensáveis no nosso dia-a-dia, como por exemplo, constituem uma importante classe de antioxidantes que inibem a degradação oxidativa de materiais orgânicos, incluindo um grande grupo de organismos aeróbios biológicos e de produtos comerciais [38].

Graças à sua estrutura, os compostos fenólicos conseguem reagir com radicais livres, e por isso têm a capacidade de exercer uma ação antioxidante (como dador de elétrons). A atividade de um antioxidante é avaliada pela sua reatividade como agente dador de elétrons; pelo local de interação do radical antioxidante resultante, que é controlado pela sua habilidade para estabilizar e deslocalizar o elétron desemparelhado; pela reatividade com outros antioxidantes e pelo potencial de transição metal-quelato. Existem estudos *in vitro*, que demonstram que muitos compostos fenólicos são melhor antioxidantes que as vitaminas E ou C [28,29].

Devido ao grupo -OH, estes compostos podem sofrer uma oxidação, uma vez que perdem com facilidade o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo da molécula do fenol, que é o passo inicial da oxidação, num processo em que ocorre a transferência de um próton e de um elétron, **Fig. 1.4**, através do qual o fenol é convertido num radical fenóxido que por sua vez fica também neutralizado.

Depois de formado, o radical pode sofrer uma substituição eletrofílica na posição *para* e/ou *orto*, exceto quando uma destas posições está ocupada [40-42]. Estudos realizados por HPLC, em soluções de fenol eletrolisadas em elétrodos de pasta de carbono e em GCE revelaram que os produtos de oxidação do fenol são diversas espécies de quinonas [43,44]. O comportamento eletroquímico do fenol e de moléculas que contêm o grupo fenol, está descrito na literatura [39, 45-47].

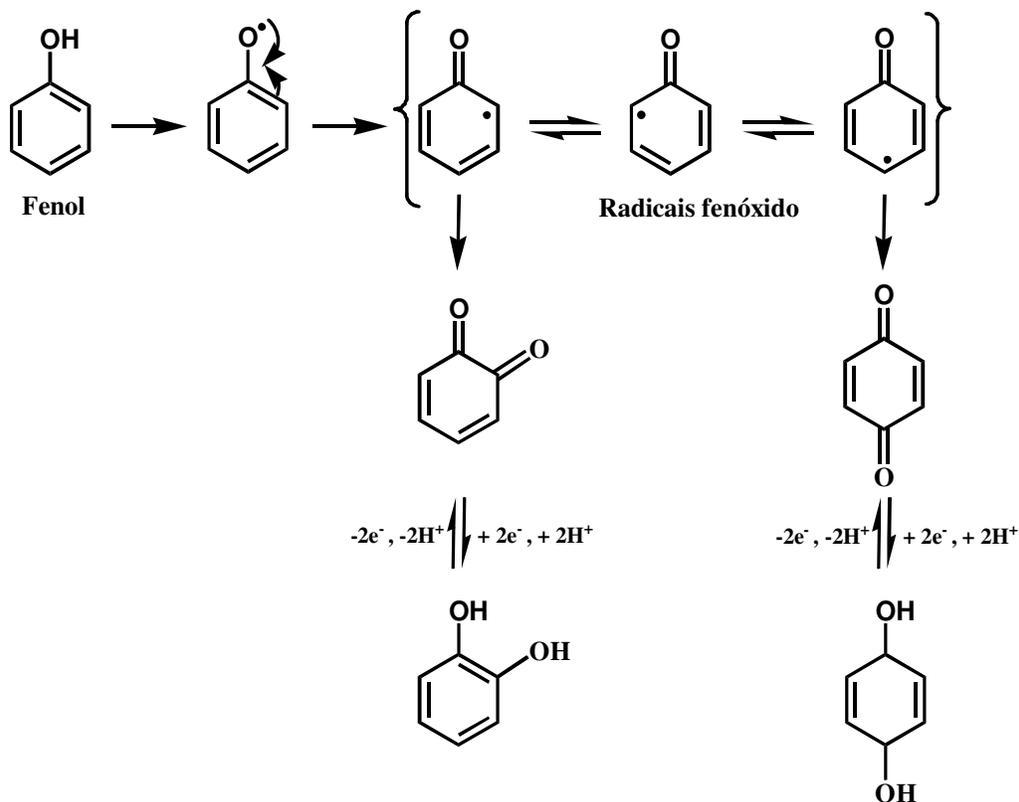


Figura 1.4 Esquema da reação de oxidação do fenol, com a formação do radical fenóxido e produtos do tipo quinona [39].

A remoção de radicais livres e as atividades dos compostos fenólicos dependem do arranjo dos grupos funcionais da estrutura nuclear do composto, do número de anéis benzeno hidroxilados e da configuração dos grupos hidroxilo dadores de prótons. As ligações duplas conjugadas permitem a deslocalização eletrônica através da molécula estabilizando o radical fenóxido [48-50].

Devido ao elevado número, os compostos fenólicos são agrupados em classes de acordo com o número de carbonos existentes na sua estrutura base. As classes principais são: fenóis simples (fenóis substituídos), ácidos fenólicos e aldeídos (contém grupos carboxílicos ou aldeído), flavonóides e compostos poliméricos lignina e taninos.

Da classe geral dos flavonóides fazem parte os compostos de baixo peso molecular derivados do benzo- γ -piranos que contêm vários grupos hidróxilo unidos aos anéis de estrutura C6-C3-C6' designados respetivamente por A, C e B, **Fig. 1.5**. A sua atividade como antioxidantes depende das propriedades redox dos seus grupos -OH e da relação estrutural entre as partes da estrutura química das moléculas.

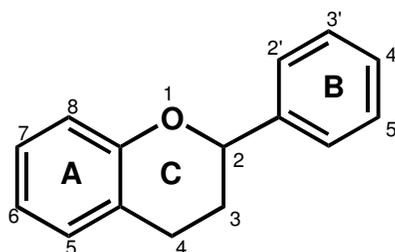


Figura 1.5 Estrutura geral dos flavonóides

Uma das formas de distinguir as diferentes subclasses dos flavonóides consiste no tipo de ligação do anel B ao C, no estado de oxidação e nos grupos funcionais do anel C.

O oxigénio é essencial para os organismos vivos. Inevitavelmente, durante o metabolismo aeróbio, ocorre a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS - *reactive oxygen species*) produzidas a partir da redução parcial do oxigénio e de outros radicais livres. Como exemplos de ROS temos o radical peróxido (O_2^{\cdot}), o radical hidróxilo ($\cdot OH$) e o radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}). As espécies oxidantes provocam danos acumulativos em moléculas fundamentais do organismos, tais como as proteínas, os lípidos e o DNA, tendo um impacto negativo no metabolismo celular, dando origem ao *stress oxidativo*, que por sua vez dá origem a doenças como o cancro e ao Síndrome da Dificuldade Respiratória do Adulto (SDRA). Apesar disso, o organismo tem mecanismos de defesa contra espécies oxidantes mas, nas situações em que a sua geração é excessiva, as defesas do organismo não são suficientes [51].

As propriedades antioxidantes dos flavonóides, que lhes permitem eliminar estas espécies, depende sempre da estrutura e dos substituintes do grupo heterocíclico e do anel B, mais concretamente (i) da presença de um grupo catecol no anel B, uma vez que este doa eletrões mais facilmente e é um alvo dos radicais, e (ii) a dupla ligação C2-C3 conjugada com a função cetona no C4, responsável pela deslocalização dos eletrões no anel B [29,52].

1.3.1.1. Daidzeína

A daidzeína (DZ) (7,4'-dihidroxiisoflavona), **Fig. 1.6**, é uma isoflavona que se encontra normalmente nos legumes e em maior abundância na soja e nos seus derivados, e em plantas não comestíveis, como o *kudzu* e o trevo vermelho.

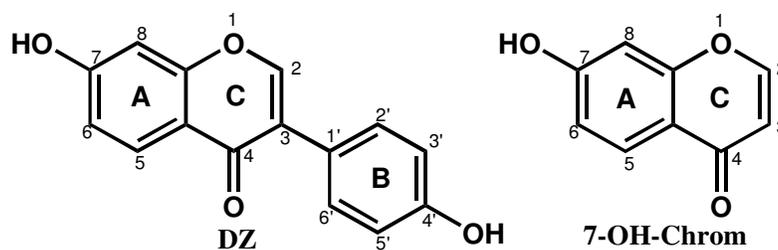


Figura 1.6 Estruturas químicas da daidzeína e da 7-hidroxi-4-cromona.

A molécula DZ possui uma grande variedade de propriedades biológicas que podem influenciar os processos bioquímicos e fisiológicos, entre as quais se destacam a sua elevada capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* [53], a atividade antiestrogénica [54-56], anti-inflamatória [57], a inibição da atividade enzimática e é igualmente eficaz na prevenção de uma série de patologias entre as quais as doenças cardiovasculares que estão associadas ao aumento do *stress oxidativo* [58,59].

O cancro é o crescimento incontrolado de células que dão origem a tumores e, nalguns casos, pode atingir os tecidos adjacentes propagando-se através de metástases, para outras partes do corpo. Dados epidemiológicos revelam que a incidência de algumas doenças, nomeadamente alguns tipos de cancros, varia com a localização geográfica, sendo maior nos países ocidentais da América do Norte e Europa, quando

comparado com os países Asiáticos, principalmente devido ao impacto da alimentação no desenvolvimento da doença, que no caso dos países Asiáticos a dieta é muito rica em soja e nos seus derivados, fornecendo assim elevadas quantidades diárias de diferentes tipos de isoflavonas cerca de 25 a 50 mg, em particular de daidzeína e de genisteína, **Fig. 1.6**, enquanto nos países ocidentais a quantidade diária é muito baixa, aproximadamente 0,01 a 0,1 mg [60,61].

A DZ possui propriedades anticancerígenas e atua bloqueando o crescimento descontrolado das células, inibindo o desenvolvimento e sobrevivência das células cancerosas. Os estudos clínicos distinguem o seu efeito a longo prazo, no sentido da redução do risco de cancro e revelam que as linhas de ação da DZ como anticancerígeno podem passar por:

- inibição de topoisomerase-DNA induzindo a apoptose (morte programada das células), que deveria ocorrer com as células tumorais;
- supressão da angiogénese, processo pelo qual ocorre o desenvolvimento e formação de novos vasos sanguíneos que sendo induzida por células tumorais proporciona a difusão vascular e a propagação do tumor;
- inibição da indução à diferenciação em linhas celulares para o cancro [62-65].

As diferentes propriedades benéficas da DZ estão certamente relacionadas com a sua elevada capacidade antioxidante que está bastante evidenciada em muitos sistemas de interesse biológico. Os estudos efetuados sobre a relação entre a estrutura da molécula e a sua atividade antioxidante demonstraram que a DZ permite retardar a oxidação dos lípidos nas membranas de lipossomas através de dois mecanismos possíveis: (i) captura de radicais livres, onde o anel B (4'-OH) é mais eficaz e (ii) alteração da fluidez da membrana através da incorporação de isoflavonas, de modo a dificultar a mobilidade dos radicais [66].

Do grão de soja puro são extraídas as isoflavonas sob a forma de heterosídeos glicosilados como a DZ que não é adsorvida pelo organismo humano porque contém um grupo açúcar.

Após ingestão oral dos produtos de soja ou derivados, e por ação das enzimas hidrolíticas das bactérias intestinais, a DZ perde o açúcar e toma a forma de uma aglicona com o nome Daidzeína, formando-se também outros metabolitos, **Fig. 1.7**.

Este processo diminui os possíveis efeitos tóxicos da DZ e facilita a sua excreção biliar e urinária porque a molécula aumenta a sua hidrofiliabilidade.

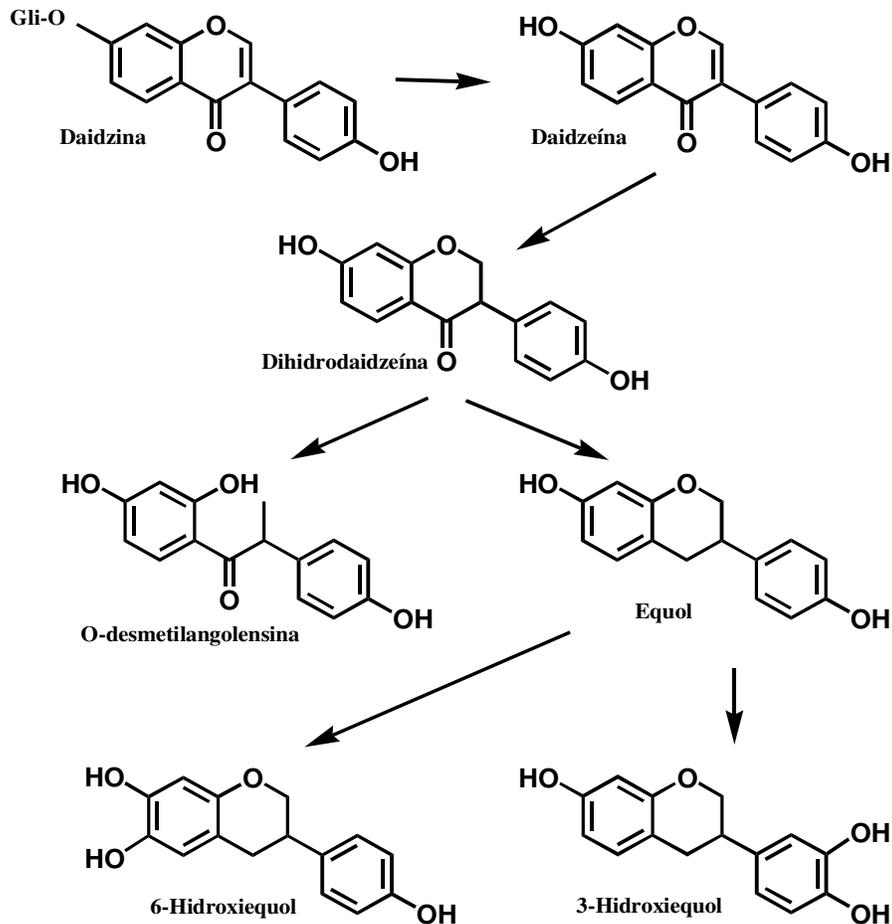


Figura 1.7 Vias metabólicas da Daidzeína (adaptado [70]).

Apenas as formas agliconas das isoflavonas e os seus produtos metabólicos são absorvidos pela barreira epitelial do intestino e capazes de atravessar a membrana plasmática. No fígado, a maior parte é conjugada com o ácido glucurónico e a restante com o sulfato. Depois de absorvida, a DZ é transportada por lipoproteínas para o sistema linfático antes de entrar no sistema circulatório. As lipoproteínas fazem a distribuição pelos diferentes tecidos extra-hepáticos onde a DZ exerce efeitos metabólicos que variam consoante o tipo de tecido, uma vez que as isoflavonas

apresentam afinidade para recetores específicos. A excreção da DZ ocorre principalmente pela via urinária. A concentração da molécula no organismo vai afetar as propriedades biológicas da DZ [61,67].

O mecanismo de ação da DZ a nível molecular não está completamente esclarecido e são necessários mais estudos para esclarecer como é que a molécula exerce os seus efeitos biológicos [68-70].

Devido ao elevado interesse biológico dos compostos fitoestrogénios, concretamente a isoflavona DZ, a sua análise qualitativa e quantitativa é muito importante em fluidos e tecidos biológicos, em alimentos e mais recentemente em suplementos alimentares e formulações farmacêuticas que são utilizadas na terapia de substituição hormonal e, por este motivo, existem vários estudos realizados com as mais diversas técnicas.

Na determinação da DZ os métodos cromatográficos são muito úteis porque permitem determinar algumas propriedades físicas dos fitoestrogénios e dos seus metabolitos, sendo possível a identificação correta e a quantificação de cada um. A escolha do método depende sempre da sensibilidade necessária, do tipo de matriz da amostra, que por sua vez também influencia o tempo gasto na preparação da amostra e na análise e o consumo de reagentes [71].

Entre os métodos analíticos mais utilizados para a quantificação da DZ em diferentes matrizes estão a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) [72,73] acoplada com detetor de eléctrodos coulométricos [74,75], a cromatografia gasosa (GC) [76] acoplada com espectrómetro de massa (GC-MS) [77], cromatografia líquida (LC) [78-80], eletroforese capilar de zona (CZE) com deteção UV [81] e deteção eletroquímica [82,83].

Existem alguns estudos relativos ao comportamento redox da DZ, em que se aplicam técnicas eletroquímicas como a voltametria cíclica e a voltametria hidrodinâmica [84]. Os métodos voltamétricos devido à sua elevada sensibilidade são muito usados para avaliar a atividade antioxidante de vários flavonóides [85-88], neste contexto, o conhecimento dos processos redox é importante uma vez que permite estudar as vias metabólicas da DZ que estão associadas às reações redox *in-vivo*.

1.3.1.2. Clioquinol

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina, CQ), **Fig. 1.8**, é um derivado halogenado da 8-hidroxiquinolina, que pertence à classe dos agentes quimioterapêuticos e à família dos compostos farmacêuticos chamados de anti-infecciosos, ou seja, agentes antimicrobianos que previnem infecções ou a sua propagação, através da eliminação ou inibição da multiplicação de um micro-organismo.

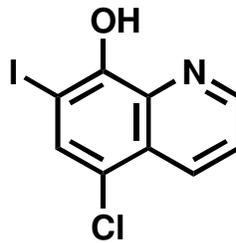


Figura 1.8 Estrutura química do clioquinol.

Fazem parte dos agentes antimicrobianos os compostos farmacêuticos antibacterianos, antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiprotazoários. O CQ é um medicamento antibacteriano e antifúngico muito utilizado no tratamento de infecções da pele como eczema, pé de atleta e outras infecções fúngicas [89].

No período entre 1950 e 1970, o clioquinol era usado por via oral, como agente antiparasitário para o tratamento e prevenção da amebíase intestinal. No entanto, o seu consumo oral foi banido em 1970 e as formas orais foram retiradas do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses e australianos, mais concretamente o síndrome denominado neuropatia mielo-ótica subaguda (SMON) [89,90]. Apesar disso, as formulações tópicas para o tratamento de infecções fúngicas e parasitárias continuaram disponíveis. Estudos recentes da análise epidemiológica contrariaram os dados relativos entre a SMON e o uso oral do clioquinol, e em vez disso associaram o seu aparecimento a uma deficiência de vitamina B12 ou a uma fórmula diferente do medicamento usado no Japão uma vez que, nos outros países a taxa de incidência da doença era quase nula [90,91]. Nos últimos anos, o clioquinol reapareceu para o tratamento de doenças não infecciosas, como as doenças cancerosas e as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington.

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa do cérebro cujas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam na perda irreversível das faculdades cognitivas superiores. Uma das características desta doença é a deposição de placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares que combinados com perda neuronal afetam a zona do hipocampo e as zonas do neocórtex resultando em demência e morte [92]. Estudos indicam que a neurodegeneração da doença começa com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) que resulta na produção, agregação e deposição de placas senis extracelulares, agregados de peptídeos β -amilóide (β A), extremamente tóxicos, e também a deposição de fibrilas intracelulares de proteína tau polimerizada [93]. Este conjunto de toxinas proporciona a demência e a neurodegeneração que são as características principais da doença.

O equilíbrio de metais é crítico para funções fisiológicas, particularmente no sistema nervoso central onde os metais são essenciais para as atividades enzimáticas, para o bom desempenho mitocondrial, na neurotransmissão, na memória e no processo de aprendizagem. O cérebro acumula metais que influenciam o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Os íons metálicos como o cobre, o zinco e o ferro funcionam como mediadores no mecanismo do *stress oxidativo* dando origem a ROS ou radicais livres que proporcionam elevados níveis tóxicos de peptídeos β A [94].

Estudos realizados no sentido de desenvolver uma terapêutica alternativa baseiam-se na solubilização e na remoção dos peptídeos β A recorrendo à utilização de agentes quelantes de metais que têm a capacidade de se ligarem a vários íons metálicos de forma a proporcionarem no organismo a eliminação/redução desses metais [95], e atuam na doença, formando complexos metaloproteicos com os metais e dissolvendo os peptídeos β A. As propriedades quelantes do clioquinol permitiram nos últimos anos a realização de vários estudos científicos com o objetivo de averiguar o seu efeito no tratamento da doença de Alzheimer. O clioquinol tem a capacidade de quelar o cobre e o zinco das placas senis e da fenda sináptica, fazendo com que estes entrem nas células evitando deste modo o excesso do íon cobre [93], que se acredita estar diretamente relacionado com a doença. O clioquinol tem características altamente lipofílicas, é rapidamente adsorvido e a sua excreção faz-se através de metabolitos, principalmente sob a forma de glucuronídeo. Ensaio em ratos demonstraram que o clioquinol reduz a deposição amilóide, comprovando assim que o composto tem a capacidade de dissolver os peptídeos β A [96]. Devido à sua alta hidrofobicidade a molécula é eficiente a

atravessar a barreira hematoencefálica. Apresenta afinidade moderada para os íons cobre e zinco, mas altamente seletiva e eficiente a provocar a dissociação destes íons metálicos dos sítios de ligação dos peptídeos β A. As propriedades metalobiológicas do clioquinol podem afetar o equilíbrio metal- β A, promovendo a dissolução de agregados β A e inibindo os seus efeitos neurotóxicos. Além disso, reduzindo os íons cobre e zinco, o clioquinol está a atuar como antioxidante [94,97,98]. Os resultados obtidos em estudos iniciais com doentes revelaram-se promissores relativamente aos possíveis efeitos nefastos derivados da ingestão oral do composto [99,100].

A doença de Huntington é uma doença hereditária, degenerativa e fatal do sistema nervoso que causa alterações de personalidade, perda progressiva de memória e habilidades cognitivas, e movimentos espásmicos característicos conhecidos como coreia de Huntington. O gene de Huntington provoca a produção de uma proteína tóxica, a huntingtina mutante nos neurónios e, acredita-se que a mesma destrói os neurónios causando os efeitos degenerativos da doença. O efeito do clioquinol sobre esta doença está a ser estudado. Acredita-se que o efeito quelante da molécula interfere com a produção da proteína mutante Huntington, interrompendo a sua produção, mas o mecanismo de ação continua desconhecido sendo por isso necessários mais estudos [101]. Relativamente à doença de Parkinson, cuja principal característica é a morte progressiva dos neurónios produtores de dopamina, de acordo com os estudos *in vivo*, o clioquinol tem sido usado para atenuar os efeitos neurotóxicos da toxina 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina, a mais comum normalmente associada à degeneração do sistema nigroestriatal (produtor de dopamina) [102].

As propriedades do clioquinol também permitem a sua utilização como possível anticancerígeno. Acredita-se que a molécula é capaz de inativar a enzima superóxido dismutase -1 e matar as células cancerígenas. A atividade anticancerígena do clioquinol é confirmada em vários estudos com recurso a células cancerosas do peito e da próstata [103,104].

Apesar da eficácia demonstrada no tratamento das doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington, os mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetivos do clioquinol *in vivo* permanecem ainda pouco claros. O conhecimento das propriedades redox do clioquinol e dos seus derivados é muito importante para um melhor entendimento das suas atividades biológicas, da capacidade antioxidante e da sua toxicidade. O comportamento eletroquímico da redução do clioquinol já foi estudado

por polarografia com o eletrodo de gota pendente de mercúrio mas a oxidação eletroquímica ainda não está descrita na literatura.

1.3.2. Indóis: Isatina e derivados azotados

Os indóis têm como estrutura base um composto orgânico aromático com uma estrutura bicíclica, constituída por um anel benzeno ligado a um anel pirrol, **Fig. 1.9**. Estes compostos ocorrem predominantemente em produtos naturais de várias plantas e como metabolitos de bactérias e fungos [105].

O indol é um núcleo farmacodinâmico muito importante e os seus derivados possuem uma variada gama de propriedades biológicas, entre as quais anti-inflamatórias, analgésicas, antibacterianas, anticonvulsivas, cardiovasculares, neuroprotetivas e também antioxidantes [106-110].

A isatina (1*H*-indol-2,3-diona, ISA), **Fig. 1.9**, é provavelmente um dos derivados mais importantes do indol. É um derivado metabólico da adrenalina e por isso está presente no cérebro, tecidos e fluidos humanos [111,112]. A sua distribuição é distinta e descontínua, alcançando concentrações máximas no cérebro de ($0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ou $\sim 1 \mu\text{M}$), encontradas no hipocampo e no cerebelo [113,114]. Encontra-se também distribuída na natureza, em produtos naturais como algumas plantas do género *Isatis*, em *Calanthe discolor* LINDL e em *Couropita guianensis* Aubl. [115,116].

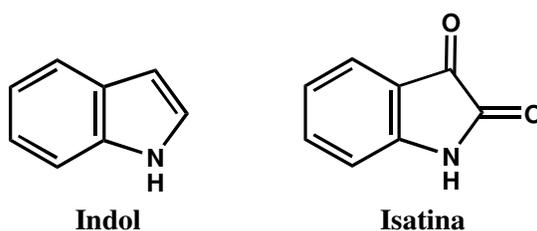


Figura 1.9 Estruturas químicas do indol e da isatina.

Entre as várias funções da ISA, a função de modulador em diferentes processos bioquímicos tem servido de base a inúmeros estudos na última década. A descoberta da ISA deveu-se inicialmente a um possível agente inibidor da monoamina oxidase endógena (MAO) [117], e mais tarde foi identificado como um inibidor específico da

MAO B [118,119]. Outros estudos revelaram que a ISA atua também como inibidor da atividade do recetor guanilato ciclase, estimulada pelo peptídeo atrial natriurético [120] e também pelo óxido nítrico [121].

A ISA tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos e a sua importância deve-se ao facto da molécula ser um composto heterocíclico muito versátil e por isso é frequentemente utilizada como substrato na síntese de uma enorme variedade de derivados que possuem um amplo perfil farmacológico, que incluem diversas aplicações clínicas [122-124].

Os derivados da ISA que possuem o grupo funcional hidrazona, **Fig. 1.10**, entre eles a isatina-3-hidrazona e a 7-metil-isatina-3-hidrazona, pertencem a um importante grupo de compostos chamados de hidrazonas. Este grupo funcional e mais propriamente o protão azometino (-NHN=CH-) permitiu desenvolver uma importante classe de novas moléculas e está já demonstrado que as mesmas possuem atividade antimicrobiana, anticonvulsante, analgésica, anti-inflamatória, antituberculosa e antitumoral [125-127].

Nos estudos *in vitro* realizados em linhas de células leucémicas humanas, estes derivados inibem o desenvolvimento das células e a síntese de DNA, diminuindo o ciclo celular das células cancerosas em cerca de 40% [128].



Figura 1.10 Estruturas químicas dos derivados da ISA com o grupo funcional hidrazona.

Os derivados da ISA que possuem os grupos semicarbazona e tiosemicarbazona, representados na **Fig. 1.11**, possuem um amplo perfil farmacológico e, de acordo com alguns autores, a atividade biológica das tiosemicarbazonas resulta do facto de estes compostos apresentarem afinidade para a enzima ribonucleotideo redutase, que é a responsável pela duplicação do DNA, por isso atuam como inibidores

de enzimas, através de reações redox, por interação com o DNA ou inibindo a síntese do DNA [129] e são potenciais inibidores de proteases cisteínas parasíticas identificadas nos parasitas da malária e tripanossomas [130-132]. A atividade biológica também é atribuída à capacidade de formar complexos do tipo quelatos, onde as tiossemicarbazonas atuam como ligantes ao doar pares de elétrons aos íons metálicos [133].

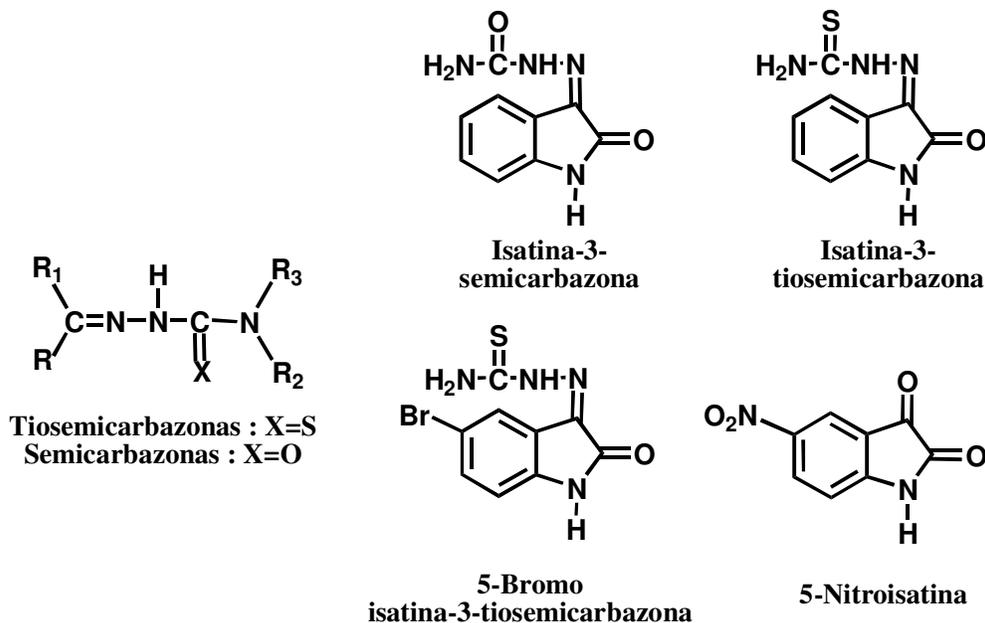


Figura 1.11 Estruturas químicas dos derivados da ISA com os grupos funcionais semicarbazonas e tiossemicarbazonas.

As isatinas- β -tiossemicarbazonas são moléculas muito vantajosas no combate a tumores que desenvolvem resistência múltipla aos fármacos e por este motivo são alvo de inúmeros estudos na tentativa da descoberta de novos medicamentos.

A glicoproteína-P é uma proteína de membrana, responsável pelo transporte de agentes xenóbioticos e químicos citotóxicos endógenos para fora da célula. Ou seja, esta proteína pode impedir que determinados medicamentos exerçam os seus efeitos citotóxicos resultando assim no insucesso dos tratamentos de alguns tumores. Neste contexto, são estudadas uma série de moléculas na tentativa de desenvolver fármacos capazes de inibir a proteína ou o seu modo de ação. As moléculas testadas são derivadas da isatina com o grupo funcional tiossemicarbazona e nitrato [134].

Os derivados da isatina-3-tiosemicarbazona, entre os quais, a isatina-3-semicarbazona, a isatina-3-tiosemicarbazona, a 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona e a 5-nitroisatina e os seus complexos metálicos possuem atividade anticancerígena [135,136], são agentes antibacterianos, antivirais [137], antifúngicos, antituberculose [138] e anti-HIV [139], atividades biológicas que são comuns com a ISA e com o composto indol [140].

Alguns compostos aromáticos que contêm na sua estrutura o grupo nitro são frequentemente utilizados como agentes quimioterapêuticos nas doenças cancerosas e cardiovasculares e também como anticonvulsantes [141,142].

Ultimamente, a química do indol e mais propriamente da ISA e dos seus derivados, têm recebido muita atenção devido às elevadas aplicações clínicas e sintéticas dos compostos. A versatilidade e as propriedades biológicas e farmacológicas da ISA permitiram aumentar o interesse nos seus derivados, mas apesar dos estudos realizados e da sua importância, pouco se sabe relativamente ao mecanismo redox destes compostos. Existem alguns estudos na literatura acerca do comportamento eletroquímico da ISA e de alguns derivados, tanto em meio aquoso como em meio não aquoso, recorrendo à voltametria cíclica com elétrodo de carbono vítreo ou com elétrodo de mercúrio [143-145].

1.4. *Princípios da eletroquímica*

Uma grande parte dos fenómenos biológicos, vitais e fundamentais no desenvolvimento e na manutenção da vida, correspondem a processos metabólicos e fisiológicos que envolvem a separação e a transferência de substâncias carregadas. Muitas das reações químicas que ocorrem nos seres vivos são do tipo redox e delas fazem parte as reações que fornecem energia necessária para a preservação da vida.

A eletroquímica envolve o estudo de fenómenos químicos que estão associados à separação das cargas num determinado sistema. Para assegurar eletroneutralidade, ocorrem duas ou várias reações de transferência de carga, em direções opostas. À exceção das reações redox homogêneas, as meias-reações estão separadas espacialmente e, geralmente ocorrem em eléctrodos diferentes, imersos em solução dentro da mesma célula eletroquímica [146].

Os eléctrodos estão ligados por meios condutores, quer externamente através de fios condutores (fios eléctricos, etc.), quer no interior da solução através do eletrólito de suporte (transporte iónico), de tal modo que a carga possa ser transportada. Nos processos eletroquímicos, a reação eletroquímica ocorre sempre no *eléctrodo de trabalho*, na interface eléctrodo-eletrólito de suporte. O potencial do eléctrodo de trabalho é controlado através do *eléctrodo de referência* e com a ajuda de um potenciostato. O eléctrodo de referência utilizado na experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada de modo a não passar corrente por ele. A corrente da célula eletroquímica flui entre o eléctrodo de trabalho e o *eléctrodo auxiliar* através do eletrólito de suporte.

A maioria dos processos de transferência de carga envolvem a transferência de electrões. O eléctrodo pode atuar apenas como dador (no caso de uma redução) ou como recetor (no caso de uma oxidação) de electrões transferidos para ou de espécies em solução. Para uma reação de eléctrodo, o estado de equilíbrio é caracterizado pela equação de Nernst, que relaciona o potencial do eléctrodo com a concentração das espécies em solução. Considerando o caso geral da reação redox,



em que O (espécie oxidada) recebe n elétrons e transforma-se em R (espécie reduzida). O par O | R tem uma energia associada, a energia redox, E_{redox} , que pode ser relacionada com o potencial de eletrodo. A equação de Nernst é dada por :

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*}$$

onde C_O representa a concentração da espécie oxidada e C_R a concentração da espécie reduzida, em solução. A aplicação de um potencial ao eletrodo influencia o nível eletrônico ocupado mais elevado no eletrodo, o nível de Fermi, E_F . Num eletrodo de trabalho, os elétrons são sempre transferidos de e para o nível de Fermi.

Numa experiência eletroquímica, ao aplicar-se um potencial ao eletrodo de trabalho, várias espécies eletricamente carregadas podem sofrer reações eletroquímicas e vão ser atraídas para a superfície deste eletrodo, através de forças eletrostáticas. Ao mesmo tempo, outras espécies presentes na solução também podem interagir com a superfície do eletrodo de trabalho através da adsorção. Por este motivo, é necessário ter em conta o transporte das espécies para a superfície do eletrodo e a reação de transferência de elétron daí resultante.

O movimento das espécies em solução, dentro de uma célula eletroquímica, é denominado de transporte de massa e pode ocorrer por difusão, migração e convecção. A concentração de espécies na interface depende do transporte de massa do interior da solução para a superfície do eletrodo.

O transporte de massa por convecção é provocado pelo movimento da solução e consequentemente das espécies devido a forças mecânicas, ou seja, quando se roda/gira o eletrodo, quando se agita a solução ou quando um fluxo de solução atravessa a célula.

A migração consiste no movimento das espécies carregadas resultante do efeito do campo elétrico, criado pela deslocalização das cargas entre os eletrodos. A migração só afeta espécies carregadas e o seu efeito é minimizado com recurso a uma quantidade elevada de eletrólito inerte.

A difusão consiste no movimento natural das espécies em solução devido a um gradiente de concentração e ocorre para todas as espécies. Este processo faz parte de todas as medições eletroquímicas.

Na proximidade da superfície do eletrodo (*camada de difusão*) as espécies são transportadas só através da difusão. Uma representação esquemática da transferência de eletrão na superfície do eletrodo está representada na **Fig. 1.12**, [146,147].

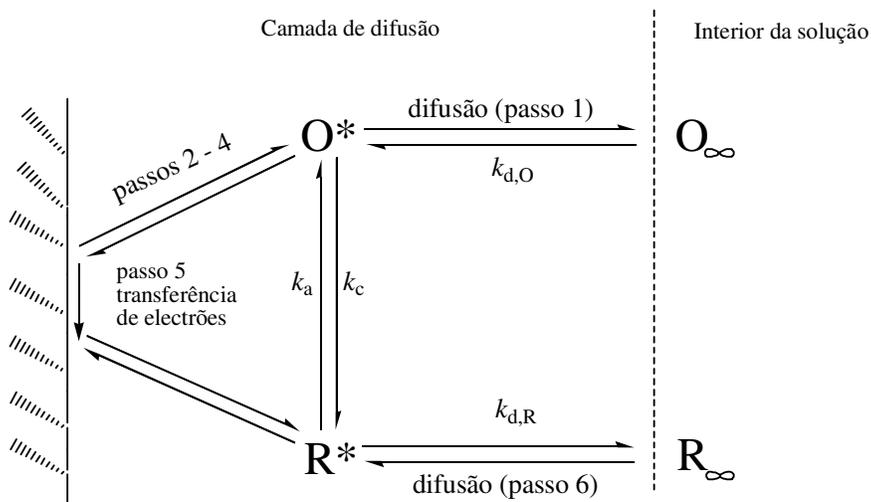


Figura 1.12 Esquema da transferência de eletrão num eletrodo; *passo 1* – difusão; *passo 2* – rearranjo da atmosfera iónica; *passo 3* – reorientação dos dipolos do solvente; *passo 4* – alterações nas distâncias entre o ião central e os ligandos; *passo 5* – transferência do eletrão [147].

Na **Fig. 1.12** distinguem-se os seguintes parâmetros:

- k_d – coeficiente de transferência de massa que descreve a velocidade de difusão da solução dentro da camada de difusão, junto à superfície do eletrodo. Este processo é descrito pelas leis de Fick;
- k_a e k_c – constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica respetivamente, que descrevem a cinética da reação do eletrodo;
- $k_{d,O}$ e $k_{d,R}$ – coeficientes de transferência de massa das espécies O e R, que geralmente são diferentes uma vez que os coeficientes de difusão também são diferentes;
- a formação da *dupla camada eletrolítica* que é a região interfacial onde ocorrem as reações eletrolíticas e onde o valor do potencial eletrostático difere do interior da solução. O conceito básico consiste num ordenamento de cargas na superfície do eletrodo e num ordenamento de uma quantidade igual de carga oposta para neutralizar a carga do eletrodo. A constante de proporcionalidade

entre o potencial aplicado e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial na solução é a *capacidade da dupla camada* [146,147].

Em todas as experiências eletroquímicas, considera-se que durante a reação de oxidação o eletrodo de trabalho funciona como recetor de eletrões transferidos e a corrente anódica, I_a , tem um valor positivo. Contrariamente, durante a reação de redução o eletrodo de trabalho funciona como dador de eletrões e a corrente catódica, I_c , tem um valor negativo.

Dos vários métodos existentes para estudar os processos de eletrodo, as técnicas de voltametria são as mais utilizadas e têm sido usadas para identificar espécies presentes em solução de forma a obter dados quantitativos e qualitativos e para estudar a natureza e os mecanismos das reações que ocorrem no sistema eletroquímico.

A voltametria consiste na medição da corrente que flui através do eletrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação de um potencial a um eletrodo dá origem a uma corrente faradaica, I_f , diretamente relacionada com a transferência de carga, e uma corrente capacitiva, I_c , necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada do eletrodo. A corrente total registada é: $I_t = I_c + I_f$.

Uma corrente faradaica, I_f , devida à reação do eletrodo, é registada na zona relevante de potencial onde ocorre a reação de eletrodo mas a corrente total também uma contribuição capacitiva, I_c . Ao varrer o potencial a carga da dupla camada varia e esta contribuição aumenta com o aumento da *velocidade de varrimento*, v , a variação de potencial em função do tempo. A curva de corrente em função do potencial, $I = I(E)$, registada durante o ensaio voltamétrico designa-se por *voltamograma* ou *onda voltamétrica*.

As técnicas de voltametria mais usadas são:

- *técnicas de varrimento cíclico de potencial* – incluem a voltametria cíclica (CV) e consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial, que varia de forma cíclica com o tempo;
- *técnicas de degrau e impulso* – incluem a voltametria de impulso diferencial (DP) e de onda quadrada (SW) e consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente que altera instantaneamente o sistema.

1.4.1. Voltametria cíclica (CV)

A experiência de voltametria cíclica (CV - “Cyclic Voltammetry”) envolve a aplicação de um potencial ao elétrodo de trabalho que se altera em função do tempo, **Fig. 1.13**. Quando se inicia o estudo eletroquímico de uma substância, recorre-se normalmente a esta técnica, uma vez que permite obter de forma rápida a informação relativa aos potenciais a que ocorrem os eventuais processos de transferência de carga e caracterizar a natureza destes [148].

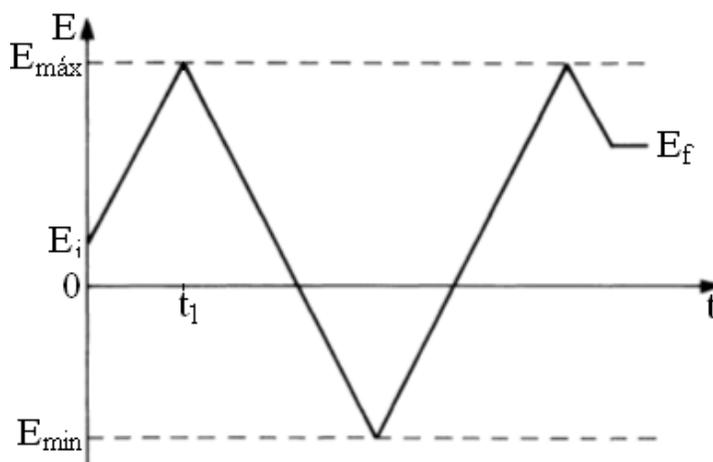


Figura 1.13 Representação esquemática da variação de potencial com o tempo em voltametria cíclica. E_i – potencial inicial, E_f – potencial final, E_{\max} – potencial máximo, E_{\min} – potencial mínimo.

O potencial aplicado varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE / dt$. Em voltametria de varrimento linear, o varrimento do potencial segue uma determinada direção, entre o potencial inicial, E_i , parando num potencial final previamente escolhido, E_f , como demonstrado na **Fig. 1.13**. Ao atingir $t = t_1$, a direção de varrimento é invertida e variada até E_{\min} , e depois invertida e variada até E_{\max} , sucessivamente. Os parâmetros importantes são a velocidade de varrimento, v , a direção de potencial e os parâmetros representados na **Fig. 1.13**.

Durante o varrimento, no sentido positivo, ocorre a reação $O + e^- \rightarrow R$, em que R é gerado eletroquimicamente, como indica a corrente catódica. Depois de invertido o varrimento ocorre $R + e^- \rightarrow O$, em que R é oxidado a O, como indica a corrente anódica [148].

Um potenciostato regista a corrente faradaica, I_f , resultante da reação do eléctrodo e também uma corrente capacitiva, I_c : ao varrer o potencial, a carga da dupla camada varia e esta contribuição aumenta com o aumento da velocidade de varrimento.

A CV permite verificar a reversibilidade e a presença de passos químicos associados às transferências eletrónicas e também a ocorrência de adsorção do reagente ou dos produtos no eléctrodo de trabalho. A principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas e para a identificação de espécies presentes em solução. Não é uma técnica recomendada para determinações analíticas uma vez que não apresenta a sensibilidade requerida para determinações quantitativas, sendo facilmente superada pelas técnicas de degrau e impulso.

Transferência eletrónica reversível

Numa experiência de CV de um sistema de transferência de carga reversível, o produto da oxidação ou redução inicial é depois reduzido ou oxidado, respetivamente, depois de invertido o varrimento de potencial, **Fig. 1.14**. A condição final para um sistema reversível é a *equação de Nernst*.

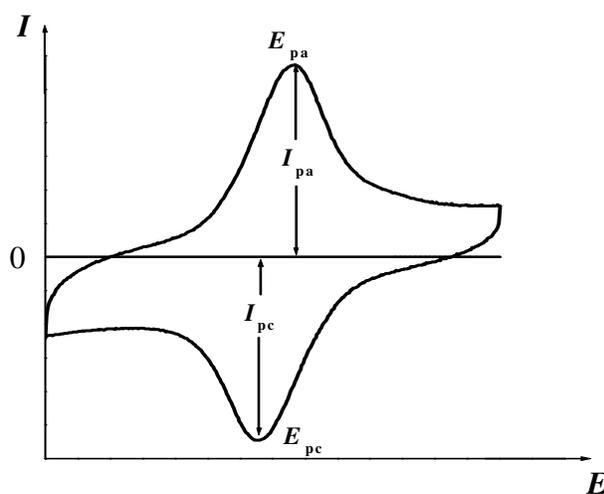


Figura 1.14 Voltamograma cíclico para uma reação reversível [147].

A forma da curva é explicada do seguinte modo: depois de alcançado o potencial onde começa a reação do eléctrodo, a corrente sobe num voltamograma de

estado estacionário, até atingir o potencial de corrente máximo. Contudo, a criação de um gradiente de concentração e o consumo de espécies eletroativas levam a que, no decorrer do varrimento, antes de atingida a *corrente de pico*, I_{pa} , a concentração de espécies eletroativas diminua e conseqüentemente a corrente começa a decair.

Os parâmetros importantes que permitem caracterizar um processo de elétrodo são: o potencial de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) e as intensidades máximas de corrente anódica (E_{pa}) e catódica (E_{pc}), resultantes da reação de oxidação e redução, respetivamente.

Para que num determinado sistema eletroquímico ocorra uma transferência eletrónica reversível, é necessário que obedeça às seguintes condições:

$$\left| \begin{array}{l} I_p \propto \nu^{1/2} \\ E_p \text{ independente de } \nu \\ |E_p - E_{p/2}| = 56,6/n \text{ mV} \\ E_{pa} - E_{pc} = 57/n \text{ mV} \\ |I_{pa} / I_{pc}| = 1 \end{array} \right.$$

Aplicando estas condições de reversibilidade, é possível calcular o número de eletrões transferidos na reação eletroquímica. Se a reação for reversível, pode também calcular-se o potencial formal de redução, $E^{0'}$, pela equação:

$$E^{0'} = \frac{E_{pc} - E_{pa}}{2}$$

Nas situações em que estas condições não se verificam, o sistema é considerado como *quasi-reversível* ou *irreversível*.

Transferência eletrónica irreversível

No caso de uma reação irreversível o perfil voltamétrico é o mesmo mas quando se inverte a direção do varrimento, podem não aparecer picos no varrimento inverso. Nestes casos, verifica-se que o potencial de pico, E_p , varia linearmente com o $\log \nu$.

Uma transferência eletrónica irreversível deve obedecer às seguintes condições:

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = 47,7/(\alpha n') \text{ (mV)}$$

$$\left| \frac{\partial E_{pa}}{\partial \log v} \right| = \frac{29,6}{\alpha n} \text{ mV}$$

$$E_p \text{ dependente de } v$$

A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e os valores de I_{pa} e I_{pc} tornam-se bastante diferentes. O sistema não obedece à *equação de Nernst*. O efeito qualitativo será o desvio do pico catódico para potenciais mais negativos e do pico anódico para potenciais mais positivos.

A região de escala de tempo (ou de v) intermédia entre os processos reversível e irreversível é denominada de quasi-reversíveis. Em sistemas quasi-reversíveis, observa-se um pico reverso, mas com $\Delta E_p > 57 / n \text{ mV}$.

A adsorção de reagentes ou dos seus produtos redox na superfície do eléctrodo de trabalho influencia bastante a resposta voltamétrica de um sistema eletroquímico. As moléculas orgânicas, devido ao carácter hidrofóbico, adsorvem facilmente na superfície de eléctrodos sólidos e podem estar orientadas na superfície do eléctrodo seguindo uma geometria específica das várias orientações, consoante o potencial aplicado ao eléctrodo ou da concentração da substância na solução. Independentemente da orientação das moléculas que adsorvem na superfície do eléctrodo, o fenómeno tem uma grande influência sobre os resultados eletroquímicos [146].

Os efeitos da adsorção na resposta voltamétrica de sistemas irreversíveis são vários, desde o efeito catalítico da reação redox até ao bloqueamento da superfície do eléctrodo e a forma da onda voltamétrica é alterada.

1.4.2. Voltametria de impulso diferencial (DPV)

Um degrau de potencial ou corrente aplicada representa uma alteração instantânea no sistema eletroquímico e o resultado da evolução do sistema depois desta perturbação permite deduzir as reações de eléctrodo e as suas velocidades. O

desenvolvimento das técnicas de degrau e impulso de potencial teve o objectivo de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total registada. Depois de aplicado o degrau de potencial, a corrente capacitiva decai exponencialmente com o tempo, enquanto a corrente faradaica resultante da reação eletroquímica decai a uma velocidade inferior. A vantagem destas técnicas é o aumento da sensibilidade e melhores características nas aplicações analíticas [146].

A voltametria de impulso diferencial (DPV- “*Differential Pulse Voltammetry*”) consiste na aplicação de pequenos impulsos de potencial sucessivos de amplitude de impulso ΔE_p , em intervalos periódicos de tempo, τ , sobre uma rampa ou escada de potencial com um degrau de ΔE_s . As medições de corrente são efetuadas imediatamente antes da aplicação do impulso (I_1) e no fim do impulso (I_2). A diferença entre estas duas correntes é o valor registado num voltamograma de impulso diferencial, **Fig. 1.15** [146]. A forma do pico e a sua corrente são fortemente influenciados pelos processos químicos e eletroquímicos envolvidos [148].

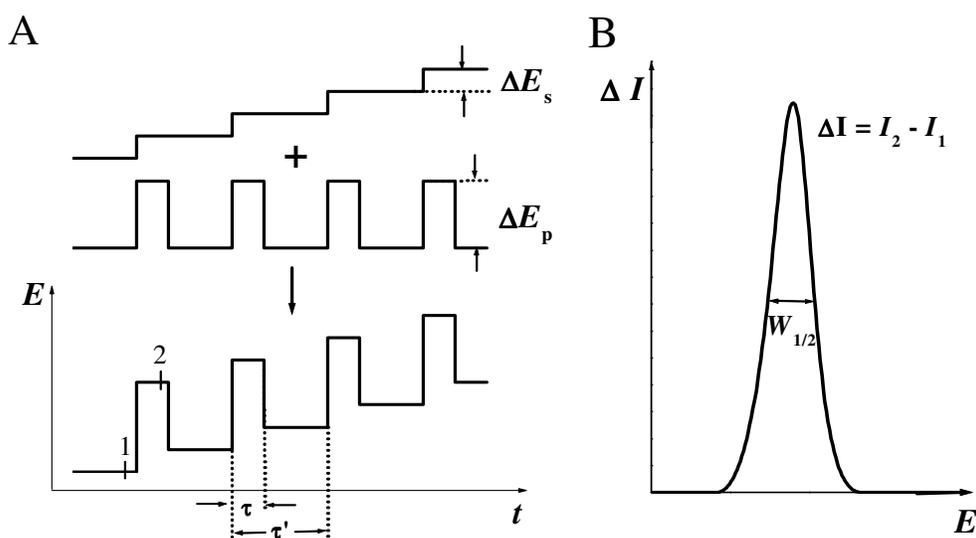


Figura 1.15 DPV. A) Esquema da aplicação de potenciais e B) perfil I vs. E típico em DPV [147].

Como a voltametria de DP é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, ou seja, um pico. O potencial do pico, E_p , pode ser identificado aproximadamente com $E_{1/2}$. Aumentando a

irreversibilidade do sistema, E_p afasta-se de $E_{1/2}$ (sistema reversível), simultaneamente a largura do pico aumenta e a sua altura diminui [146].

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 ΔE_s a velocidade de varrimento $\nu = \tau \Delta E_s$. Nesta técnica a velocidade de varrimento efetiva varia entre 1-10 mV s⁻¹ [146].

A intensidade do pico de corrente I_p é proporcional à concentração do analito, mas também depende da velocidade da reação eletroquímica.

O tratamento quantitativo relativo a sistemas reversíveis demonstrou que, só com R (sinal positivo) ou só com O (sinal negativo) presente inicialmente, pode escrever-se a equação para o potencial máximo,

$$E_{max} = E_{1/2} \pm \frac{\Delta E}{2}$$

onde ΔE é a amplitude do impulso.

A amplitude escolhida para o impulso de potencial ΔE_p deve ter em consideração a reação em estudo e a sensibilidade exigida, uma vez que grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem impossibilitar a deteção de corrente faradaica, conduzindo a uma perda de resolução.

Para amplitudes de impulso pequenas, quando $\Delta E \rightarrow 0$, a largura a meia altura do pico de corrente, $W_{1/2}$, é inversamente proporcional ao número de eletrões transferidos:

$$W_{1/2} = \frac{3,52RT}{nF} = \frac{91}{n}$$

permitindo deste modo caracterizar o mecanismo de transferência de carga. [146].

1.4.3. Voltametria de onda quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada (SWV-“*Square Wave Voltammetry*”)foi desenvolvida por Barker em 1952 e hoje é considerada uma técnica analítica muito importante.

A onda gerada consiste numa onda quadrada de impulso ΔE_p de larga amplitude sobreposta numa escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s , e com período τ , **Fig. 1.16**. Devido à construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eléctrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, a aplicação de um impulso de potencial negativo [146].

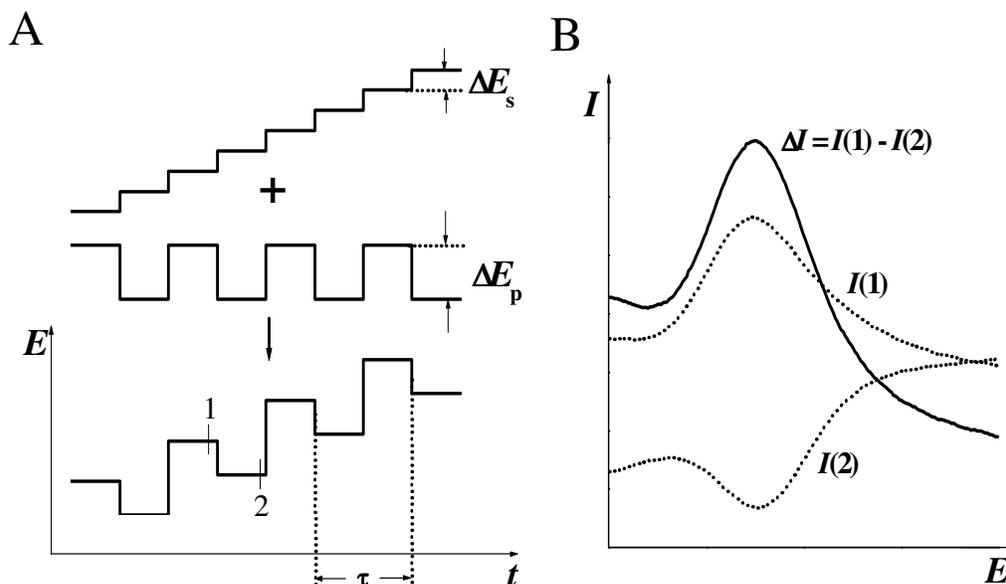


Figura 1.16 SWV. A) Esquema da aplicação de potenciais e B) perfil I vs. E típico em SWV [147].

Nesta técnica, as medições realizam-se antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, e em cada ciclo (1 e 2 na **Fig. 1.16A**). A *corrente total*, ΔI (I_t) registada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial direto – *corrente directa* (I_f - *forward current*), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – *corrente inversa* (I_b - *backward current*), e $I(2)$ possui sinal contrário a $I(1)$. Por este motivo, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$ [146].

A técnica de voltametria de SW apresenta uma sensibilidade maior relativamente à técnica de voltametria de DP, no caso de sistemas reversíveis, esta vantagem está associada ao tipo de amostragem e tratamento de corrente realizado na voltametria de SW. Uma outra vantagem está relacionada com a velocidade de

varrimento, enquanto a voltametria de DP funciona com velocidades de varrimento efetivas de 1 - 10 mV s⁻¹, a voltametria de SW pode alcançar 1 V s⁻¹, permitindo deste modo um menor consumo de espécies eletroativas relativamente à voltametria de DP e reduz os problemas relacionados com o bloqueamento da superfície do eléctrodo. A velocidade efectiva, v_{ef} , é calculada pela expressão:

$$v_{ef} = \Delta E_s \times f$$

A subtração das correntes diretas e inversas permite realizar determinações eletroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra, uma vez que é possível remover a corrente devida à redução do oxigénio dissolvido, tornando a análise mais rápido e menos dispendiosa [146].

Capítulo 2

Experimental

Neste capítulo apresenta-se uma descrição dos reagentes, soluções, métodos de investigação, instrumentação eletroquímica, tratamento dos dados e condições experimentais utilizadas ao longo deste trabalho, no estudo eletroquímico das moléculas descritas no capítulo anterior, por voltametria cíclica, voltametria de impulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

2.1. Reagentes e soluções

A temozolomida, o clioquinol, a daidzeína e a 7-hidroxi-4-cromona, todos de pureza superior a 90% foram adquiridos à Sigma e usados sem qualquer tipo de purificação. O grupo dos compostos derivados da isatina foram sintetizados pelo grupo do Prof. Ângelo C. Pinto, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil [122,149-152].

Foram preparadas soluções mãe de concentração ~ 1mM para cada um dos compostos e guardadas a 4°C até serem utilizadas. As concentrações específicas utilizadas nas medidas voltamétricas estão referidas nos capítulos seguintes e foram obtidas por diluição da respetiva solução mãe no eletrólito de suporte desejado, diretamente na célula eletroquímica.

As soluções mãe do clioquinol, da daidzeína e dos derivados da isatina foram preparadas em etanol. A solução mãe de 7-hidroxi4-cromona foi preparada em água/etanol na proporção 2:1. As outras soluções, incluindo as dos eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH, de força iónica 0,1 M, descritas na **Tab. 2.1** [153] foram preparadas a partir de reagentes de pureza analítica e em água desionizada ultrapura, obtida através de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$), Millipore S.A., França.

As medições de pH foram realizadas com um medidor de pH Crison micropH 2001 (Barcelona, Espanha), com um eletrodo de vidro combinado Ingold.

Para dosear os nano e os micro-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.

Tabela 2.1. Composição das soluções tampão de eletrólito de suporte [153].

Eletrólitos de suporte (diluições para 100mL)	pH
0,2 M KCl (25 mL) + 0,2M HCl (42,5 mL)	1,2
0,2 M KCl (25 mL) + 0,2M HCl (6,5 mL)	2,0
0,2 M NaAcO (3,7 mL) + 0,2M HAcO (46,3 mL)	3,4
1 M NaAcO (7,2 mL) + 1 M HAcO (12,5 mL)	4,5
0,2 M NaAcO (41,2 mL) + 0,2M HAcO (8,8 mL)	5,4
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (6,15 mL) + 0,2M NaH ₂ PO ₄ (43,85 mL)	6,1
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (30,5 mL) + 0,2M NaH ₂ PO ₄ (19,5 mL)	7,0
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (47,35 mL) + 0,2M NaH ₂ PO ₄ (2,65 mL)	8,0
0,025M Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O (50 mL) + 0,1 M NaOH (3,0mL)	9,2
0,2 M KCl (25 mL) + 0,2M NaOH (6,0 mL)	12,0
0,2 M KCl (25 mL) + 0,2M HCl (42,0 mL)	12,8

As soluções saturadas com N₂ foram preparadas pela passagem de um fluxo de gás N₂ de elevada pureza através das soluções durante no mínimo 10 minutos antes do início do ensaio voltamétrico e mantido à superfície da solução durante o ensaio. Todas as experiências foram feitas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

2.2. Instrumentação

2.2.1. Experiências Eletroquímicas

As experiências eletroquímicas de voltametria realizaram-se numa célula eletroquímica de capacidade máxima 2 mL. O eléctrodo de trabalho utilizado no estudo da temozolomida, do clioquinol, da daidzeína e da 7-hidroxi-4-cromona foi um eléctrodo de carbono vítreo (GCE) de 1,5 mm de diâmetro, da Cypress System Inc., EUA. Para o estudo dos derivados da isatina foi utilizado um eléctrodo de carbono vítreo (GCE) de 1 mm de diâmetro, da BAS Inc., Tóquio - Japão. O eléctrodo auxiliar foi um fio de platina e o eléctrodo de referência foi o eléctrodo Ag/AgCl (3M KCl), da Cypress System Inc., EUA, **Fig. 2.1**.



Figura 2.1 Célula eletroquímica e eléctrodos utilizados nos estudos eletroquímicos.

O polimento do eléctrodo de trabalho realizou-se antes de cada medida, com *spray* de diamante com partículas de diâmetro 1 μm , da Kemet International Ltd, Reino Unido. Depois do polimento, o eléctrodo foi lavado com um jato de água desionizada e foram registados vários voltamogramas em solução tampão até se obter uma linha de base estável, de modo a garantir uma superfície do GCE devidamente limpa.

Todas as experiências voltamétricas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato Autolab da Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, **Fig. 2.2**, com o *software* GPES (General Purpose Electrochemical System),

versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda, que permitiu não só o controlo dos parâmetros voltamétricos em cada experiência, como também a aquisição e o tratamento dos dados experimentais.

No tratamento dos dados e na construção dos gráficos apresentados ao longo deste trabalho foi utilizada a versão 6.0 do programa Origin® , da Microcal Software, Inc., EUA. As estruturas químicas das substâncias e todos os mecanismos apresentados foram desenhados com o programa ChemDraw Ultra, versão 8.0, da CambridgeSoft Corporation, EUA. O algoritmo de Savitsky-Golay foi utilizado sempre que houve necessidade de eliminar ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.



Figura 2.2 Potenciostato/galvanostato Autolab.

Durante as medidas voltamétricas por CV foi sempre utilizado um degrau de potencial de $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Em todas as medidas realizadas por voltametria de DP foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: largura do impulso 70 ms, amplitude de impulso 50 mV e velocidade de varrimento $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Nas medidas realizadas por voltametria de SW foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: o degrau de potencial a $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ que corresponde a uma velocidade de varrimento efectiva $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e a a frequência 50 Hz.

Os voltamogramas de DP foram sujeitos à correção da linha de base através de um algoritmo matemático “moving average” utilizando um degrau de 1 mV.

2.2.2. *Espetrofotometria de UV - Vis*

As experiências espectrofotométricas foram registradas num espectrofotômetro SPECORD S100, associado ao programa Aspect Plus, versão 1.5 da Analytic Jena GmbH, Jena, Alemanha. Foram utilizadas cuvets de quartzo com percurso óptico de 1 cm.

As condições experimentais foram: tempo de integração 25ms e uma acumulação de 1000 pontos para cada medida registrada. Todos os espectros foram realizados na gama de comprimentos de onda de 200 a 400 nm.

Capítulo 3

Estudo voltamétrico da TMZ

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos para o estudo do comportamento eletroquímico da TMZ no GCE, numa gama de eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH, recorrendo às técnicas de CV, voltametria de SW e voltametris de DP [6].

A TMZ, **Fig. 3.1**, é um medicamento antineoplásico, utilizado no tratamento de tumores cerebrais e melanomas metastáticos. As informações obtidas a partir dos resultados obtidos para diferentes valores de pH foram fundamentais pois permitiram descrever os mecanismos de oxidação e redução da molécula em vários meios, os processos de elétrodo envolvidos, a determinação do pK_a , assim como compreender o seu metabolismo em sistemas biológicos.

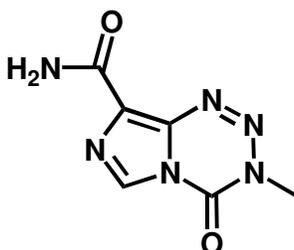


Figura 3.1 Estrutura química da temozolomida.

3.1. *Estudo eletroquímico da Temozolomida*

O estudo do comportamento eletroquímico da TMZ foi iniciado com experiências de CV em soluções de 500 μM de TMZ, preparadas diretamente em diferentes eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH, **Fig. 3.1**. CVs sucessivos foram registados a partir do 0,00 V num intervalo de potencial entre - 1,3 V e + 1,0 V, e com uma velocidade de varrimento de $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

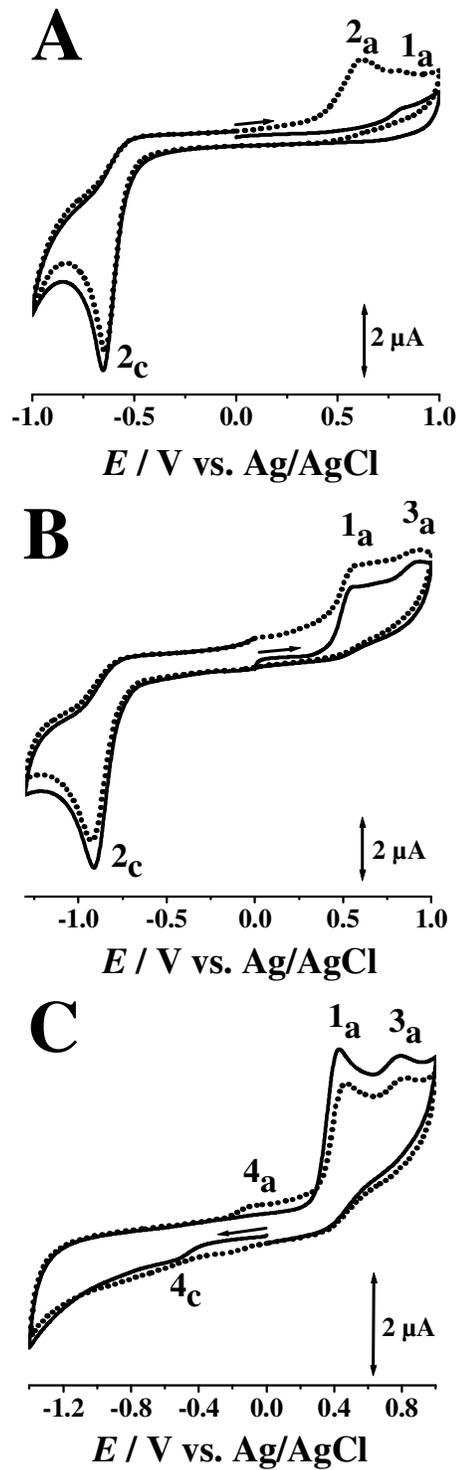


Figura 3.2 CVs obtidos numa solução 500 μM em TMZ, saturada com N_2 em: (A) pH = 2,2 (tampão KCl/HCl 0,1 M); (B) pH = 7,1 (tampão fosfato 0,1 M) e (C) pH = 9,1 (tampão NaOH/ $Na_2B_2O_7$ 0,1 M). (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Todas as soluções foram sempre saturadas com N_2 antes do início dos varrimentos cíclicos e também no decorrer das experiências voltamétricas foi mantido um fluxo constante de N_2 à superfície da solução, de modo a evitar a difusão do oxigênio atmosférico para o interior da solução de TMZ.

Nos CVs sucessivos numa solução de TMZ em meio ácido, pH = 2,2 tampão KCl/HCl 0,1 M, **Fig. 3.2A**, observou-se no primeiro varrimento o pico anódico 1a, a $E_{p1a} = + 0,8$ V, associado com a oxidação da TMZ e o pico catódico 2c, a $E_{p2c} = - 0,65$ V, associado com a redução da TMZ. A partir do segundo varrimento foi observado um novo pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,6$ V, e as intensidades de corrente de ambos os picos 1a e 2c diminuíram. Este efeito deve-se à adsorção dos produtos de oxidação e redução na superfície do eletrodo, que diminuem a área eletroativa disponível para a oxidação e redução de novas moléculas de TMZ.

Devido à complexidade do processo redox da TMZ a ocorrer na superfície do GCE e com o objectivo de obter mais informações relativamente à origem do pico 2a, realizaram-se algumas experiências de CV, utilizando um GCE com a superfície limpa, apenas no intervalo de potencial de + 0,0 V a + 1,0 V, e após vários varrimentos sucessivos, observou-se apenas o pico 1a. Deste modo verificou-se que o pico anódico 2a esta associado à oxidação de um produto eletroativo referente ao processo catódico da TMZ pico 2c, a $E_{p2c} = - 0,65$ V.

Os CVs registados numa solução de 500 μ M de TMZ, em meio neutro, pH = 7,1 tampão fosfato 0,1 M, quando comparados com os resultados em meio ácido, apresentaram, no primeiro varrimento, o pico anódico 1a, a $E_{p1a} = + 0,54$ V e um novo pico anódico 3a, a $E_{p3a} = + 0,90$ V, **Fig. 3.2B**. No varrimento reverso apareceu o pico catódico 2c, a $E_{p2c} = - 0,91$ V. Entretanto no segundo varrimento, contrariamente aos resultados anteriores a pH ácido, não foi observado nenhum pico relativo do produto de redução da TMZ, ou seja, os produtos da redução da TMZ em meio neutro são todos eletroquimicamente inativos.

Em meio alcalino, pH = 9,1 tampão NaOH/ $Na_2B_2O_7$, o CV iniciou-se igualmente a $E_i = + 0,00$ V mas, desta vez na direção negativa, e não se observou o pico catódico 2c. No varrimento reverso agora na direção positiva, apareceram os picos anódicos 1a, $E_{p1a} = + 0,42$ V e 3a, $E_{p3a} = + 0,78$ V, **Fig. 3.2C**. No segundo varrimento, apareceu um novo pico catódico 4c, a $E_{p4c} = - 0,19$ V, que corresponde à redução do produto de oxidação da TMZ formado na superfície do GCE. Depois de invertido o

sentido, aparece um novo pico anódico 4a, a $E_{p4a} = -0,10$ V, que confirma a reversibilidade do pico 4c.

A avaliação dos resultados iniciais por CV revelaram que a TMZ possui grupos funcionais eletroativos doadores e recetores de eletrões uma vez que a TMZ é oxidada e reduzida na superfície do GCE, pois foram registados picos referentes a processos anódicos e catódicos, entretanto esses processos ocorrem independentemente uns dos outros e por este motivo foram investigados em detalhe separadamente.

3.2. Redução eletroquímica

3.2.1. Voltametria cíclica

Uma vez que se verificou que a adsorção da TMZ e/ou dos seus produtos de redução é maior em eletrólitos ácidos, para evitar problemas de adsorção na superfície do GCE, os estudos de CV da redução da TMZ foram realizados em meio neutro.

CVs sucessivos foram registados na região catódica apenas no intervalo de potencial -0,6 V até -1,2 V, com $v = 100$ mV s⁻¹, numa solução de 500 µM de TMZ, preparada diretamente em pH = 7,1 tampão fosfato 0.1 M. No primeiro varrimento observou-se um único pico catódico 2c, a $E_{p2c} = -0,91$ V, **Fig. 3.2B**, e no varrimento reverso, não se observaram picos anódicos o que permitiu verificar que a redução da TMZ em pH = 7,1 é um processo irreversível. Nos varrimentos seguintes, não foi identificado qualquer outro pico anódico ou catódico mas verificou-se que a intensidade de corrente do pico 2c diminui com o número de varrimentos, o que ocorre devido à adsorção dos produtos de redução da TMZ na superfície do GCE.

A influência da velocidade de varrimento sobre a corrente do pico de redução 2c da TMZ também foi avaliada. Os CVs foram registados para diferentes velocidades de varrimento entre 15 e 500 mV s⁻¹, **Fig. 3.3**. Entre cada medida voltamétrica a superfície do GCE foi sempre limpa. Verificou-se com o aumento da velocidade de varrimento uma variação do potencial do pico 2c para valores mais negativos, confirmando assim mais uma vez a irreversibilidade deste processo catódico da TMZ.

A diferença entre o potencial do pico E_{pc} e o potencial do pico a meia altura $E_{p/2c}$ foi de $|E_{pc} - E_{p/2c}| \approx 66$ mV. Como foi referido no capítulo 1.4.1, para um sistema irreversível que é controlado por difusão, verifica-se que $|E_{pc} - E_{p/2c}| \approx 47,7 / (\alpha n')$,

onde α_c é o coeficiente catódico de transferência de carga eletroquímica e n' o número de elétrons transferidos no passo determinante da velocidade [146]. Aplicando a equação anterior aos resultados da TMZ, obteve-se o valor $\alpha_c n' = 0,72$.

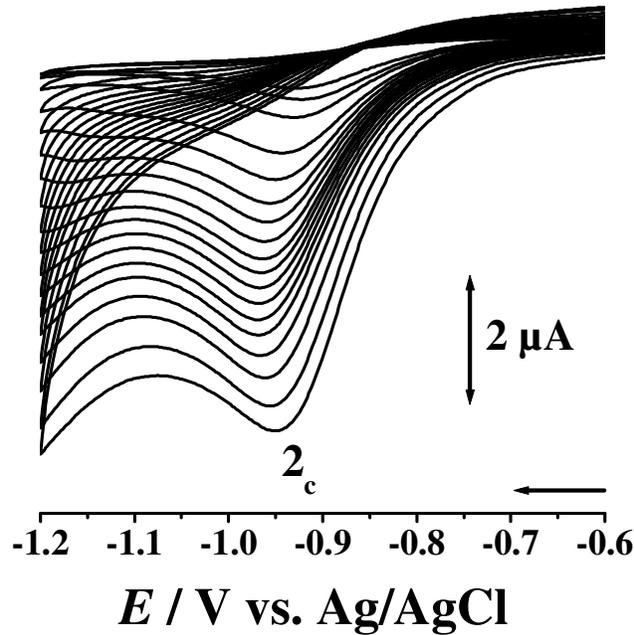


Figura 3.3 CVs obtidos numa solução 500 μM de TMZ, em $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato 0,1 M, com velocidades de varrimento a variar de 15 a 500 mV s^{-1} .

Verificou-se também que a corrente do pico $2c$ aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento. Este tipo de comportamento é específico de processos controlados pela difusão das espécies à superfície do eléctrodo. Para um sistema irreversível, controlado por difusão, a corrente do pico em ampéres é dada pela expressão:

$$I_{pc} (\text{A}) = -2,99 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2}$$

em que n é o número de elétrons transferido durante a redução da TMZ, A é a área da superfície do eléctrodo em cm^2 , D_0 é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, C_0 é a concentração da solução de TMZ na célula eletroquímica em mol cm^{-3} e v a velocidade de varrimento, em V s^{-1} [146].

Através da representação gráfica I_{pc} vs. $v^{1/2}$ determinou-se o valor do coeficiente de difusão, D_0 , da TMZ. Para a TMZ, o declive do gráfico I_{pc} vs. $v^{1/2}$ foi de $6,0 \times 10^{-6} \text{ A} / (\text{V s}^{-1})^{1/2}$, e aplicando a equação da corrente do pico, o coeficiente de difusão da TMZ calculado para $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato $0,1 \text{ M}$, é $D_{TMZ} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Para determinar o coeficiente de difusão da TMZ foi necessário calcular a área eletroativa da superfície do GCE recorrendo a uma solução de hexacianoferrato de potássio (II), $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, uma vez que o coeficiente de difusão deste composto já é conhecido, $D_0 = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [154]. A área eletroativa do GCE foi determinada através da representação gráfica de I_{pc} vs. $v^{1/2}$ dos voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de $0,5 \text{ mM}$ de $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, em $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato $0,1 \text{ M}$. De acordo com os resultados calculou-se uma área eletroativa para o GCE de $0,0111 \text{ cm}^2$.

3.2.2. Voltametria de impulso diferencial; Influência do pH

A influência do pH na redução eletroquímica da TMZ foi estudada por voltametria de DP numa vasta gama de pH entre 2 e 12, **Fig. 3.3A**.

As experiências de voltametria de DP foram todas realizadas em soluções de $500 \mu\text{M}$, de TMZ, preparadas diretamente em diferentes eletrólitos com diferentes valores de pH com força iónica $0,1 \text{ M}$ e sempre saturadas com N_2 . O pico 2c ocorreu apenas para eletrólitos de $2 < \text{pH} < 8$ e o seu potencial desloca-se no sentido dos valores mais negativos com o aumento do pH, **Fig. 3.4B**, a dependência é linear e a inclinação da recta pontilhada é de 59 mV por unidade de pH, o que significa que, de acordo com a equação de Nernst descrita na secção 1.4, no processo de redução da TMZ estão envolvidos o mesmo número de eletrões e de prótons, **Fig. 3.4B**.

O número de eletrões transferidos, n , foi determinado pela largura a meia-altura do pico. O valor teórico é $W_{1/2} \approx 91/n \text{ mV}$, secção 1.4.2, a largura a meia altura do pico 2c é $W_{1/2} \approx 100 \text{ mV}$, sendo assim, a reação eletroquímica envolve a transferência de um eletrão. Consequentemente, concluiu-se que o processo de redução da TMZ ocorre com a transferência de um eletrão e de um próton.

Também se verificou que o pH influencia a intensidade de corrente do pico, **Fig. 3.4B**. Da representação gráfica da variação de corrente do pico 2c em função do pH

verificou-se que o valor máximo da corrente de pico é obtido para pH = 2,2 tampão KCl/HCl 0,1 M.

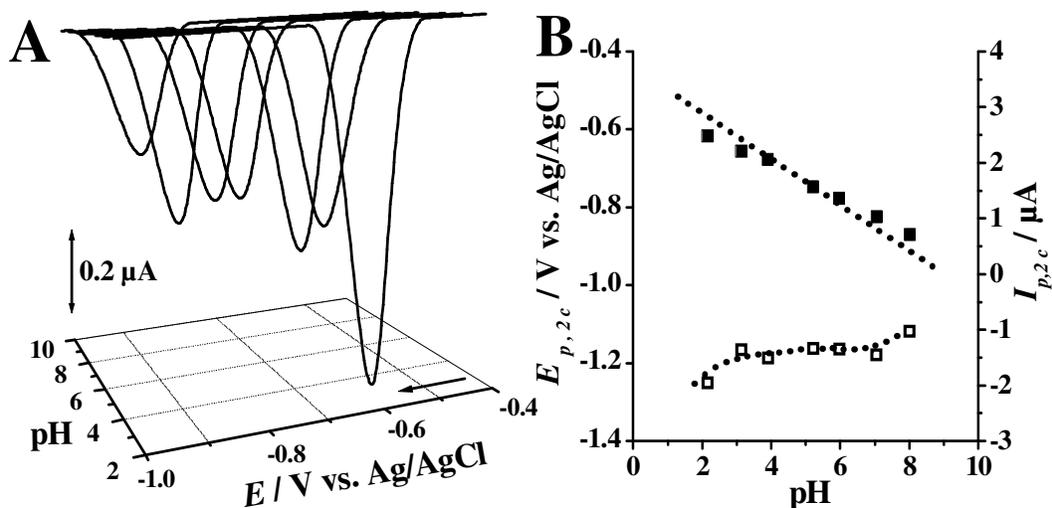


Figura 3.4 (A) Voltamograma de DP (primeiro varrimento) com correção de linha de base, em soluções de 500 μM de TMZ, em eletrólitos de diferentes pHs. (B) Gráfico da variação do (■) $E_{p,c}$ e da (□) $I_{p,c}$ do pico 2c em função do pH. O declive da reta pontuada é de - 59 mV por unidade de pH.

Com base nos resultados descritos relativamente à redução da TMZ foi proposto um mecanismo para a sua eletroredução em meio ácido, **Fig. 3.5**, no qual o pico catódico 2c envolve a adição de um elétron e de um próton ao carbono C5 para formar um radical anião, provocando a abertura irreversível do anel tetrazino.

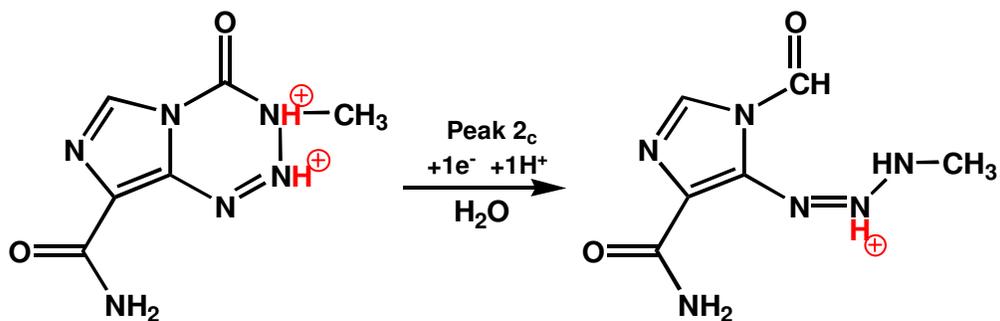


Figura 3.5 Mecanismo proposto para a redução eletroquímica da TMZ em pH = 2,2.

3.3. *Oxidação eletroquímica*

3.3.1. *Voltametria cíclica*

A oxidação eletroquímica da TMZ num GCE foi estudada por CV numa solução de 500 μM preparada directamente em tampão fosfato pH = 7,1 e os varrimentos sucessivos foram registados apenas na região anódica do potencial no intervalo de potencial de 0,0 V até + 1.0V.

Nos CVs obtidos, com velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, observaram-se dois picos de oxidação consecutivos, bem definidos e separados, **Fig. 3.2B**. Ambos os picos 1a, a $E_{p1a} = + 0,54 \text{ V}$ e o pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,90 \text{ V}$ apresentaram comportamento irreversível, uma vez que não se observaram picos catódicos na mesma zona no varrimento de potencial reverso. No segundo varrimento verificou-se uma diminuição significativa da intensidade de corrente do pico 1a e a ausência de corrente referente ao pico 3a devido à forte adsorção dos produtos de oxidação da TMZ adsorvidos na superfície do GCE.

A influência da velocidade de varrimento sobre a corrente do pico 1a também foi avaliada, em soluções de 500 μM de TMZ, preparadas em tampão fosfato pH = 7,1. Aumentando a velocidade de varrimento verificou-se um aumento de corrente do pico 1a, mas não se verificou uma relação linear de I_{p1a} com $v^{1/2}$, como seria de esperar para uma oxidação irreversível controlada por difusão. Este tipo de comportamento pode ser explicado tendo em consideração a adsorção das moléculas de TMZ e/ou dos seus produtos de oxidação na superfície do GCE.

3.3.2. *Voltametria de onda quadrada*

As experiências de voltametria de SW realizadas em soluções de 500 μM de TMZ preparadas em pH = 7,1 tampão fosfato 0,1 M, mostraram um comportamento eletroquímico idêntico aos resultados obtidos por CV. No primeiro varrimento observaram-se ambos os picos de oxidação 1a e 3a e no segundo varrimento apareceu o novo pico 4a correspondente aos produtos de oxidação adsorvidos na superfície do GCE, **Fig. 3.6A**.

A irreversibilidade de ambos os picos 1a e 3a foi confirmada pela representação gráfica das componentes direta (I_f) e inversa (I_b) obtidas a partir da

corrente total (I_t) referente ao segundo varrimento, com $v_{ef} = 100 \text{ mV s}^{-1}$, **Fig. 3.6B**. Enquanto, na componente direta apareceram os dois picos de oxidação a potenciais semelhantes aos encontrados nas experiências de voltametria de DP, assim como a mesma corrente total, na componente reversa não apareceram picos catódicos.

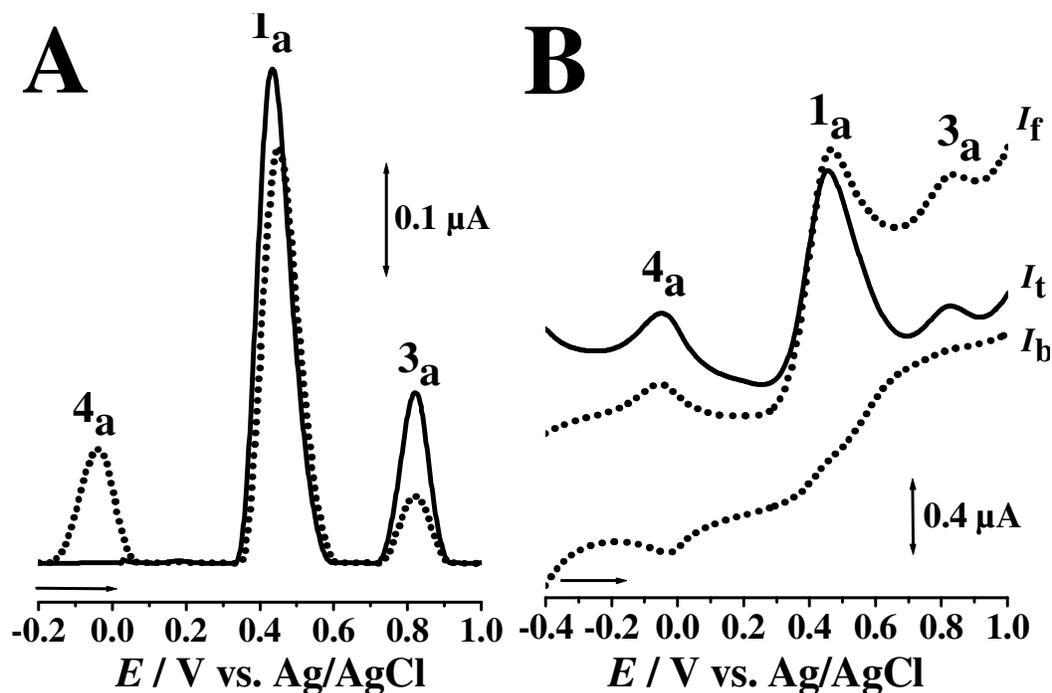


Figura 3.6 (A) Voltamogramas de SW com linha de base corrigida, obtidos numa solução $500 \mu\text{M}$ de TMZ preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 7,1$ (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos. (B) Segundo voltamograma de onda quadrada de TMZ, I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No segundo voltamograma de SW, a formação do pico 4a, que corresponde ao produto de oxidação reversível da TMZ, foi confirmada pela representação gráfica das componentes da corrente total, e obtiveram-se valores iguais para as correntes de oxidação e redução. Além disso, os valores idênticos do pico 4a nas curvas de corrente directa e inversa, obtidos a partir da intensidade total do segundo varrimento dão indicação de que o produto da oxidação da TMZ está adsorvido na superfície do GCE **Fig. 3.6B**.

3.3.3. Voltametria de impulso diferencial; Influência do pH

A influência do pH na oxidação eletroquímica da TMZ foi estudada em soluções de 500 μM de TMZ, preparadas diretamente nos vários eletrólitos de suporte, num intervalo de pH entre 2 e 12 usando voltametria de DP, **Fig. 3.7A**.

Nos voltamogramas de impulso diferencial obtidos observou-se a formação do pico 1a em todos os eletrólitos de suporte com diferentes valores de pH. Para as soluções na faixa entre $2 < \text{pH} < 9$, o potencial do pico 1a desloca-se linearmente no sentido dos valores mais negativos de potencial, à medida que o pH aumenta. A inclinação da reta de - 59 mV por unidade de pH mostra que o mecanismo deste processo de oxidação em meio aquoso envolve o mesmo número de elétrons e de prótons. O número de elétrons transferido, n , foi determinado pela largura a meia altura do pico, $W_{1/2} \approx 100$ mV, próximo do valor teórico de 90 mV, *secção 1.4.2*, correspondendo a uma reação redox em que estão envolvidos um elétron e um próton.

Para $\text{pH} > 9$, o pico de oxidação 1a foi independente do pH indicando por isso que o mecanismo passou a envolver apenas a transferência de um elétron, uma vez que o produto de oxidação da TMZ pode sofrer desprotonação química em eletrólitos alcalinos [155] e conseqüentemente foi obtido para a TMZ foi $\text{pK}_a \approx 9$.

O conhecimento do valor do pK_a é fundamental para a atividade farmacológica da molécula uma vez que influencia a absorção e a passagem dos compostos através das membranas celulares, devido aos seus efeitos sobre a lipossolubilidade e na solubilidade das moléculas. A maioria dos compostos farmacêuticos consiste em ácidos e bases fracas, presentes nas soluções sob a forma ionizada e não ionizada. As moléculas não ionizadas geralmente são lipossolúveis e podem atravessar a membrana celular mas, as moléculas ionizadas não o conseguem fazer devido à sua baixa lipossolubilidade. Portanto, a distribuição transmembranas de um eletrólito fraco é determinada principalmente pelo seu pK_a e pelo gradiente de pH através da membrana [156].

Para eletrólitos de suporte com valores de $\text{pH} > 5,0$ foi detetado um novo pico 3a, **Fig. 3.7A**, cujo potencial de oxidação também foi depende do pH e deslocou-se no sentido dos potenciais mais negativos, no intervalo de $6,0 < \text{pH} < 10,0$, **Fig. 3.7B**. O declive da reta de - 59 mV por unidade de pH indica que neste segundo processo estão também envolvidos o mesmo número de elétrons e de prótons. Tendo em consideração a largura a meia altura do pico 3a de $W_{1/2} \approx 90$ mV, este processo de oxidação envolve a transferência de um elétron e de um próton.

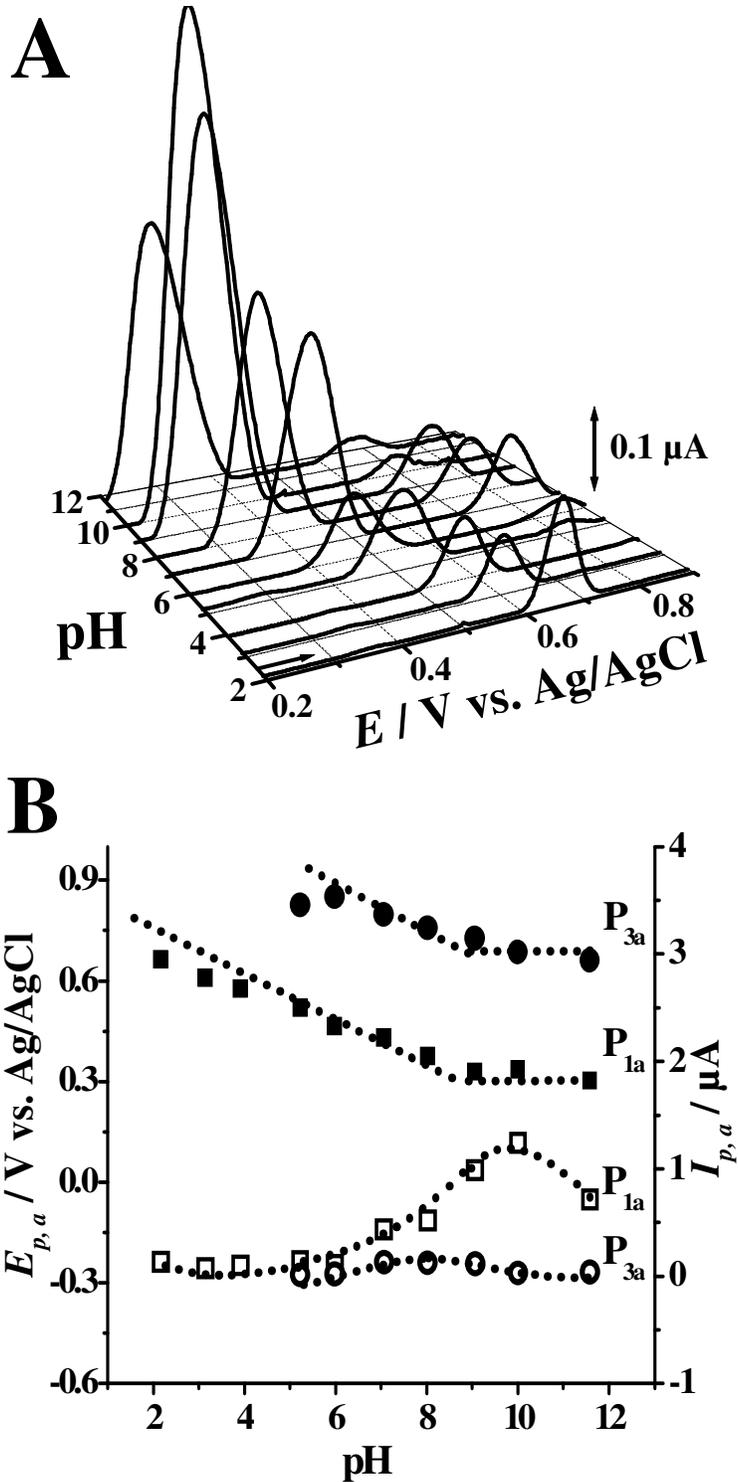


Figura 3.7 (A) Voltamogramas DP (primeiro varrimento) com correção de linha de base obtidos em soluções de 500 μM de TMZ, em função do pH. (B) Gráfico da variação com pH do (\blacksquare) $E_{p,a}$ e da (\square) $I_{p,a}$ do pico 1a e do (\bullet) $E_{p,a}$ e da (\circ) $I_{p,a}$ do pico 3a vs. pH. O declive da reta é de -59 mV por unidade de pH.

A intensidade de corrente de ambos os picos 1a e 3a também foi influenciada pelo eletrólito, sendo mais elevada no intervalo $7,0 < \text{pH} < 10,0$, atingindo o valor máximo a $\text{pH} = 10,0$, **Fig. 3.7B**.

Foram também registados voltamogramas de DP sucessivos, numa solução de $500 \mu\text{M}$ em diferentes eletrólitos, **Fig. 3.8**.

No primeiro varrimento, em tampão fosfato $\text{pH} = 7,1$, ocorreram os picos 1a e 3a, mas no segundo varrimento surgiu um novo pico 4a a potenciais mais negativos do que o pico 1a. O novo pico 4a corresponde à oxidação do produto de oxidação da TMZ. Depois de vários varrimentos sucessivos, o potencial dos picos 1a e 3a permanece quase inalterado mas a intensidade da corrente dos mesmos decresce gradualmente, **Fig. 3.8A**.

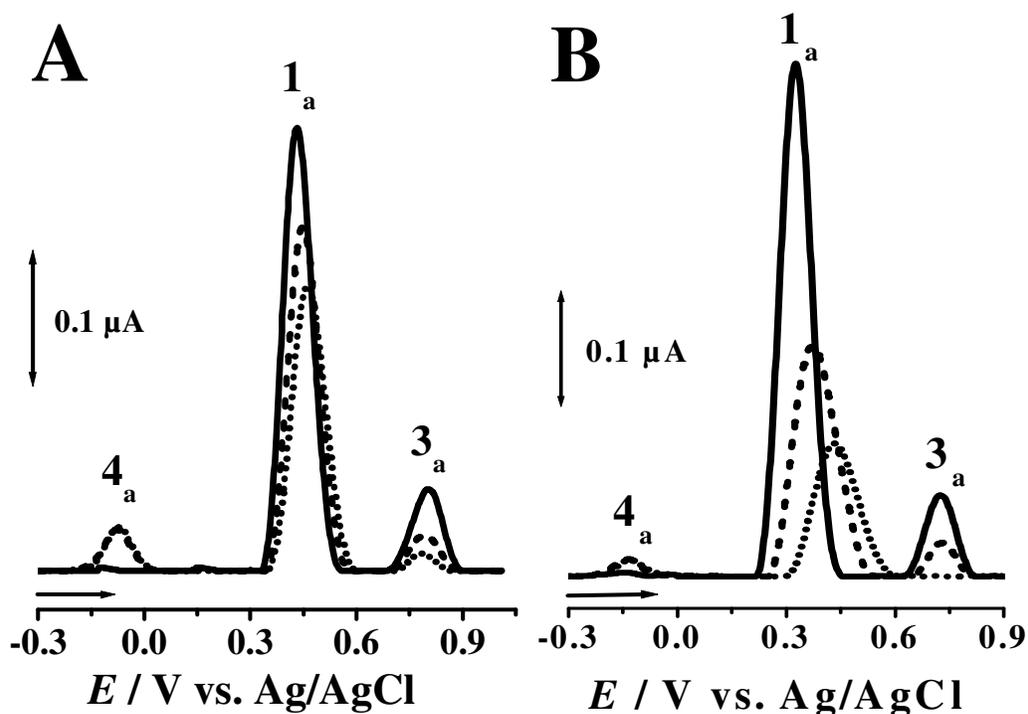


Figura 3.8 Voltamogramas de DP sucessivos registados numa solução de $500 \mu\text{M}$ de TMZ, preparada diretamente em: (A) $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ e (B) $\text{pH} = 9,1$ tampão $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ $0,1 \text{ M}$; (—) primeiro (---) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

No primeiro varrimento em meio alcalino, $\text{pH} = 9,1$ tampão $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ $0,1 \text{ M}$, **Fig. 3.8B**, observaram-se os dois picos de oxidação 1a e 3a mas no segundo varrimento apareceu um novo pico 4a e verificou-se um ligeiro desvio no potencial do

pico 1a para valores mais positivos com o aumento dos varrimentos. A intensidade de corrente dos picos 1a e 3a também diminuiu significativamente, facto que foi atribuído à forte adsorção dos produtos de oxidação da TMZ na superfície do GCE neste eletrólito.

Os voltamogramas de DP sucessivos mostraram que a adsorção do produto de oxidação da TMZ na superfície do eletrodo é mais forte em eletrólitos alcalinos do que em eletrólitos ácidos. Realizou-se uma experiência que confirmou este facto e que consistiu no registo de vários voltamogramas de DP sucessivos numa solução de TMZ e, depois de lavar o eletrodo com um jato de água desionizada, registou-se um voltamograma de DP no eletrólito de suporte e observou-se apenas o pico de oxidação do produto, o pico 4a.

Com base nos resultados descritos, foi proposto um mecanismo para a oxidação da TMZ em meio ácido, **Fig. 3.9**.

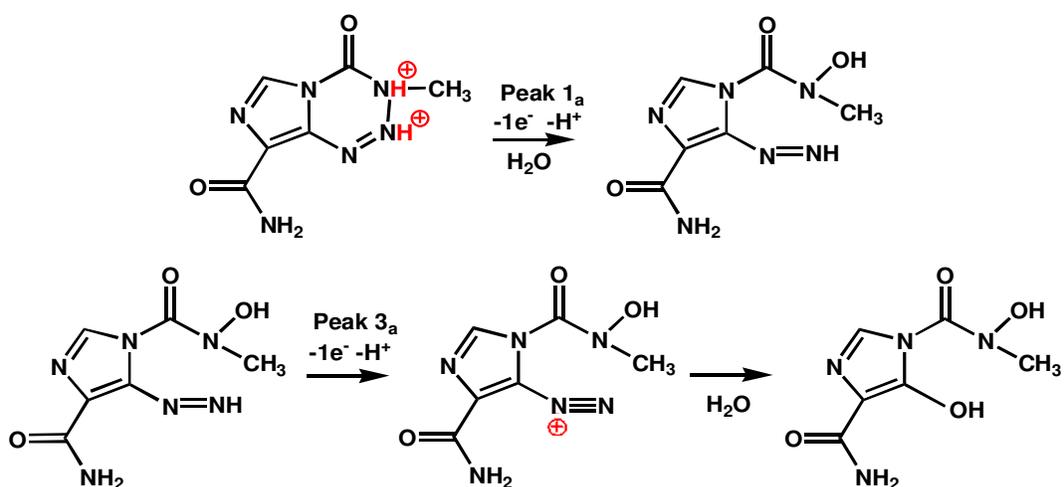


Figura 3.9 Mecanismo proposto para a oxidação da TMZ em meio ácido.

Em ambas as etapas de oxidação, está envolvida a transferência de eletrão e um protão. Na primeira etapa da oxidação, ocorre a formação do pico 1a, em que um eletrão e um protão foram removidos do anel tetrazino, seguido do ataque nucleofílico por parte da água, para formar um produto hidroxilado, provocando posteriormente a ruptura irreversível do anel tetrazino. Na segunda etapa de oxidação, em que ocorre a formação do pico 3a, foram removidos um eletrão e um protão ao nitrogénio do anel aberto na primeira etapa.

3.4. Determinação eletroanalítica da TMZ

A oxidação da TMZ e dos seus produtos adsorvidos na superfície do GCE são processos de eletrodo quantificáveis e podem ser determinados de um modo simples e pouco laborioso.

Para a determinação eletroanalítica da TMZ foi escolhido o pico 1a, uma vez que ocorre a potenciais positivos mais baixos.

O procedimento utilizado para a determinação analítica consistiu no registo de voltamogramas de impulso diferencial em soluções com diferentes concentrações de TMZ que variaram entre 0 e 13 μM , preparadas diretamente em $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato 0,1 M e a variação da corrente do pico 1a referente à primeira oxidação eletroquímica da TMZ foi utilizada como o sinal eletroanalítico, **Fig. 3.10A**.

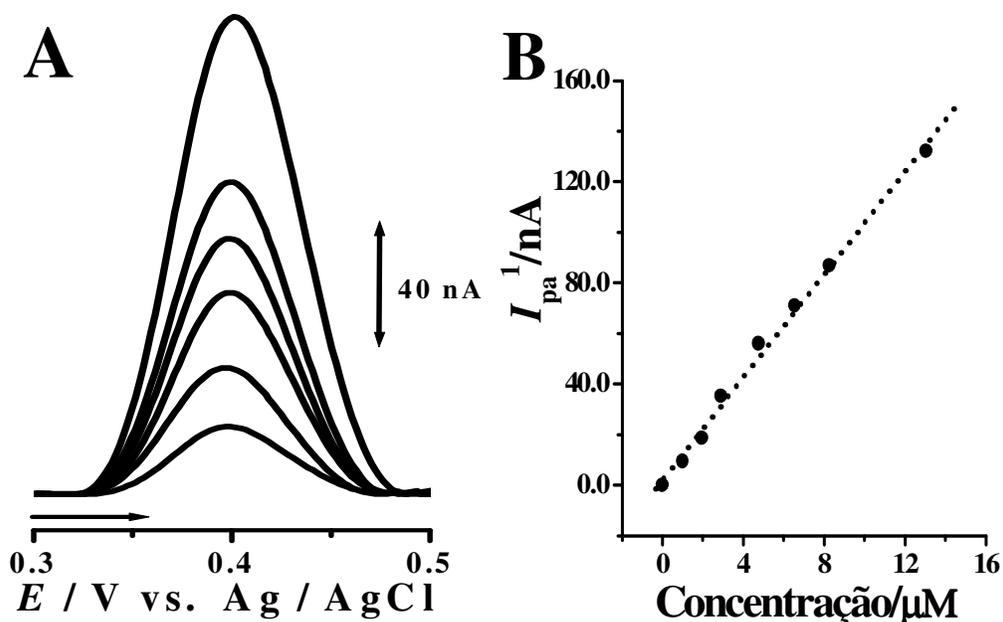


Figura 3.10 (A) Voltamogramas de DP obtidos em $\text{pH} = 7,1$ tampão fosfato. As concentrações determinadas foram 1,96, 2,91, 4,76, 6,54, 8,26, 9,90 e 13,0 μM .

(B) Curva de calibração I_{pa} vs C_{TMZ} .

Devido à adsorção dos produtos da oxidação da TMZ e de modo a assegurar a linearidade da curva de calibração e a reprodutibilidade do procedimento, a superfície

do GCE foi sempre limpa entre cada medida. Para cada concentração foram realizadas três medidas.

Seguindo este procedimento foi encontrada uma boa linearidade entre as várias correntes de pico registadas, **Fig. 3.10B**. A relação entre a intensidade de corrente e a concentração foi descrita pela equação:

$$I_{pa} \text{ (nA)} = 10,2 [\text{TMZ} / \text{mM}] + 2,9$$

em que $r = 0,997$, $n = 7$, $P < 0,0001$. Entre os parâmetros que definem a sensibilidade foram determinados os valores do limite de deteção, $LOD = 1,1 \mu\text{M}$, calculado com base em três vezes o nível do ruído, e o limite de quantificação, $LOQ = 3,7 \mu\text{M}$ calculado com base em 10 vezes o nível do ruído. É importante mencionar que cada nova medida é feita usando um GCE polido imediatamente antes da medida, e por este motivo poderão ocorrer ligeiras variações na intensidade de corrente do pico 1a e esta deve ser a principal fonte de erro do procedimento descrito.

O desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a quantificação da TMZ em fluidos biológicos, tais como a determinação eletroanalítica usando um GCE, é importante uma vez que a técnica permitirá obter informações úteis para ensaios clínicos, de um modo rápido e simples, sem recorrer a solventes orgânicos.

Capítulo 4

Estudo da oxidação dos antioxidantes

DZ e 7-OH-4-CHM

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados do estudo dos mecanismos de oxidação de dois antioxidantes, obtidos usando um GCE, numa gama de eletrólitos com diferentes valores de pH. O estudo começou pela investigação do comportamento anódico do antioxidante daidzeína (DZ) e, com o objetivo de esclarecer melhor o seu mecanismo de oxidação, foi também estudado o comportamento anódico de um composto com estrutura semelhante, a 7-hidroxi-4-cromona (7-OH-4-CHM), **Fig. 4.1** [7].

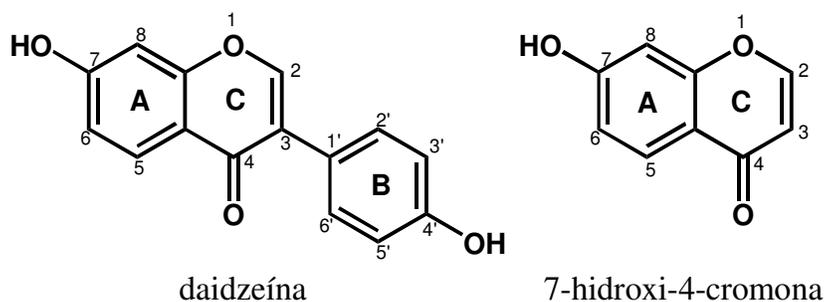


Figura 4.1 Estruturas químicas da DZ e da 7-OH-4-CHM.

A DZ é uma das isoflavonas mais abundantes na soja e nos seus derivados e a sua principal característica é a elevada capacidade antioxidante que é fundamental para a prevenção de doenças cancerígenas e cardiovasculares. Os resultados obtidos através da comparação do comportamento eletroquímico das duas moléculas permitiram avaliar o poder antioxidante dos grupos hidroxilo da molécula e também estabelecer uma comparação entre o poder antioxidante das mesmas.

4.1. *Estudo do comportamento anódico da DZ e da 7-OH-4-CHM*

4.1.1. *Voltametria cíclica*

O estudo do comportamento eletroquímico da DZ foi iniciado com experiências de CV em soluções de 300 μM de DZ em diferentes eletrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

O varrimento do potencial efetuado nas experiências de CV teve início a 0,0 V, até ao limite positivo de +1,35 V, onde foi invertido o sentido de varrimento, atingindo o limite negativo de -1,0 V. Observou-se que, independentemente do sentido inicial do varrimento (para valores positivos ou para valores negativos de potencial), os voltamogramas apresentavam sempre dois picos apenas na região anódica, o que revelou que a molécula de DZ possui apenas grupos funcionais doadores de elétrões, para as condições experimentais investigadas. Após esta observação, todas as experiências posteriores foram efetuadas apenas na região anódica.

Nas experiências de CV registadas numa solução de 300 μM de DZ, em meio ácido, pH = 4,5 tampão acetato 0,1 M, observaram-se dois picos de oxidação consecutivos, bem separados e irreversíveis, **Fig. 4.2A**. O pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,78$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,0$ V, estão associados à oxidação dos grupos fenólicos 7-OH e 4-OH da molécula de DZ, **Fig. 4.1**. No varrimento reverso, não se observaram quaisquer picos relativos à redução da DZ. Ainda na mesma solução de DZ sem limpar a superfície do eletrodo, foram registados varrimentos sucessivos de potencial, nos quais se verificou o desaparecimento de ambos os picos 1a e 2a, **Fig. 4.2A**. Este efeito deve-se à passivação da superfície do eletrodo devido a um produto de oxidação polimérico não condutor que adsorve fortemente na superfície do eletrodo impossibilitando a oxidação de novas moléculas de DZ.

Nos CVs sucessivos registados numa solução de DZ preparada diretamente em pH=7,0 tampão fosfato 0,1M, observou-se o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,56$ V e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,86$ V, quando comparado com os resultados obtidos em meio ácido, **Fig. 4.2A**, os valores de potencial para os picos 1a e 2a foram deslocados para valores mais negativos. Uma diminuição da intensidade de corrente dos picos 1a e 2a também foi verificada à medida que foram registados os varrimentos sucessivos, **Fig. 4.2B**.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

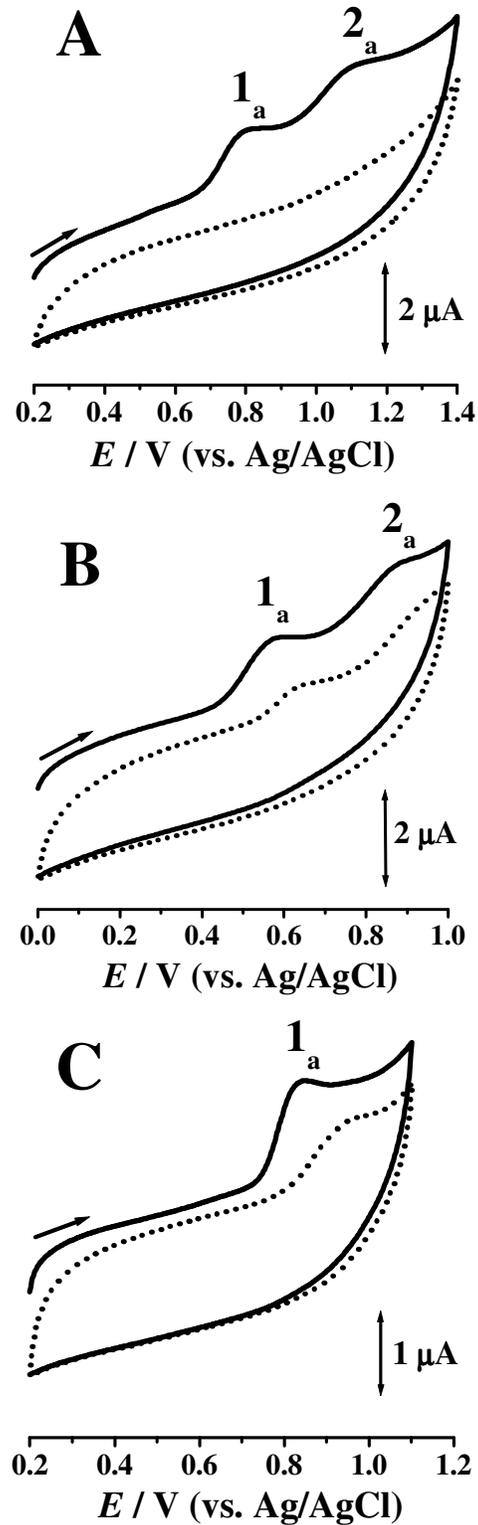


Figura 4.2 CVs obtidos num GCE: (A) 300 μM de DZ em pH = 4,5 tampão acetato; (B) em pH = 7,1 tampão fosfato e (C) em 50 μM de 7-OH-4-CHM em pH = 7,1. (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

O efeito da diminuição da intensidade de corrente deve-se à adsorção dos produtos de oxidação da DZ na superfície do GCE, que diminui a área eletroativa disponível para a oxidação de novas moléculas de DZ.

O estudo do efeito da variação da velocidade de varrimento realizou-se por CV, num intervalo de velocidades que variou entre 10 mVs⁻¹ e 800 mVs⁻¹ e numa solução de 300 µM de DZ, em pH = 7,0 tampão fosfato 0,1M. Foi observado que as correntes dos picos 1a e 2a variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que acontece quando o processo de oxidação da espécie em solução é limitado por difusão.

Considerando a velocidade de varrimento, $v = 500 \text{ mV s}^{-1}$, o declive do gráfico de Tafel é dado pela expressão $\text{declive} = \alpha_a F/2.3 RT$ e substituindo os valores obtemos para este caso $\alpha_a = 0,65$.

O número de eletrões que participam na reação do elétrodo é determinado pela expressão $|E_{pa} - E_{p/2a}| \sim 87 \text{ mV}$ e no caso de um sistema irreversível $|E_{pa} - E_{p/2a}| = 47,7 / (\alpha_a n)$ [146], *secção 1.4.1*, então $n = 1$ e na reação de oxidação do pico 1a ocorre a transferência de um eletrão.

No caso de um sistema irreversível e controlado por difusão, a corrente de pico é dada pela equação:

$$I_{pa} \text{ (A)} = 2,99 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [O]_{\infty} D_O^{1/2} v^{1/2}$$

em que n é o número de eletrões transferidos durante a primeira oxidação da DZ, A é a área eletroativa do GCE em cm², D_O é o coeficiente de difusão em cm² s⁻¹, $[O]_{\infty}$ é a concentração em mol cm⁻³ e v em Vs⁻¹ [146]. O valor do coeficiente de difusão da DZ, D_{DZ} , foi determinado através da representação gráfica I_{p1a} vs. $v^{1/2}$. Neste caso, o declive do gráfico foi de $5,6 \times 10^{-6} \text{ A} / (\text{V s}^{-1})^{1/2}$ e o coeficiente de difusão da DZ calculado para pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M é $D_{DZ} = 8,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, tendo em conta uma área eletroativa de 0,011 cm² para o GCE, de acordo com *secção 3.2.1.*

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

Para clarificar as propriedades físico-químicas da DZ e o seu mecanismo de oxidação em solução aquosa, investigou-se também o comportamento redox da 7-hidroxi-cromona (7-OH-4-CHM), uma molécula de estrutura semelhante mas apenas com um grupo fenol 7-OH no anel A e sem o anel B, **Fig. 4.1**.

Nos voltamogramas cíclicos sucessivos, registados numa solução de 50 μM de 7-OH-4-CHM, em $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1M, com velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, **Fig. 4.2C**, observou-se apenas um pico de oxidação irreversível, pico 1a, a $E_{p1a} = +0,83\text{V}$, e depois de invertido o sentido da direção, não se observaram picos de redução, tal como aconteceu com a DZ. A intensidade de corrente do pico diminui com o aumento do número de varrimentos sucessivos.

Para a velocidade de varrimento $v = 500 \text{ mV s}^{-1}$, relativamente ao o pico 1a, o declive do gráfico de Tafel é $\alpha_a = 0,67$ e uma vez que $|E_{pa} - E_{p/2a}| \sim 50 \text{ mV}$ o número de eletrões determinado para este processo de oxidação foi $n = 1$.

Considerando as estruturas químicas da DZ e da 7-OH-4-CHM as diferenças nos resultados da CV dos dois compostos são esclarecidas. O grupo hidroxilo 4-OH da molécula DZ no anel B, **Fig. 4.1**, está ausente na molécula da 7-OH-4-CHM. Portanto, o pico 1a da DZ corresponde à oxidação do grupo 4'-OH do anel B que ocorre a potenciais menos positivos, sendo mais facilmente oxidado e conseqüentemente tem um melhor poder redutor que o grupo 7-OH, resultados que explicam a atividade antioxidante da DZ *in vitro*. O pico 2a da DZ corresponde à oxidação do 7-OH do anel A que ocorre a um potencial mais elevado, o mesmo potencial do pico 1a correspondente a oxidação do grupo 7-OH do anel A da 7-OH-4-CHM.

4.1.2. Voltametria de Impulso Diferencial. Influência do pH

O mecanismo da ação antioxidante da DZ é devido à capacidade que os compostos fenólicos possuem de capturar radicais através de reações de transferência de eletrões. As reações de oxidação dos compostos fenólicos são influenciadas pelo pH do meio.

A influência do pH na oxidação da DZ e da 7-OH-4-CHM foi estudada em diferentes eletrólitos de suporte, num intervalo de pH que variou entre 2 e 12, numa solução 2,5 μM de DZ, **Fig. 4.3A**, e numa solução 50 μM de 7-OH-4-CHM, **Fig. 4.4A**, usando voltametria de DP.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

Os voltamogramas de DP mostraram concordância com os resultados de CV, em que a oxidação da DZ ocorre em duas etapas, os picos de oxidação 1a e 2a, **Fig. 4.3A**.

Para $2,0 < \text{pH} < 8,0$, o potencial do pico 1_a desloca-se progressivamente para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 4.3A**.

No gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 4.3B**, o declive da reta pontilhada é de - 59 mV por unidade de pH, indicando que o mecanismo de oxidação do pico 1a envolve o mesmo número de eletrões e de prótons. O número de eletrões transferido na reação é determinado pela largura do pico a meia altura $W_{1/2} \sim 90$ mV sendo assim, esta reação envolve a transferência de um eletrão. Assim, o pico 1a da DZ está associado à oxidação do grupo 4'-OH do anel B em que ocorre a transferência de um eletrão e um próton. Para $\text{pH} > 8,0$, a oxidação do pico 1a é independente do pH o que significa que o mecanismo envolve apenas um eletrão, **Fig. 4.3A**.

O pico 2a corresponde à oxidação do grupo 7-OH do anel A. O potencial desloca-se progressivamente para valores de potenciais mais negativos com o aumento do pH, e ocorre apenas para eletrólitos com $\text{pH} < 8,0$, **Fig. 4.3A e B**. No gráfico E_{pa} vs. pH o declive da reta pontilhada é de - 59 mV por unidade de pH e mostra que o mecanismo também envolve o mesmo número de eletrões e prótons, **Fig. 4.3B**. Tendo em consideração a largura a meia altura do pico 2a da DZ, $W_{1/2} \sim 70$ mV, conclui-se que este processo de oxidação também envolve a transferência de um próton e de um eletrão.

Do gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 4.3B**, também se observou que a intensidade de corrente dos picos é muito maior em $2,0 < \text{pH} < 5,0$. Isto deve-se ao efeito do pH na ionização dos grupos OH, uma vez que em meio ácido os grupos OH estão pouco ionizados e este facto, provoca o aumento da hidrofobicidade e adsorbabilidade da molécula na superfície hidrofóbica do GCE. Por outro lado, em meio neutro e alcalino, os grupos OH são totalmente ou quase totalmente ionizados (desprotonados) o que faz com que a hidrofobicidade seja maior e consequentemente a adsorbabilidade na superfície do GCE é menor.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

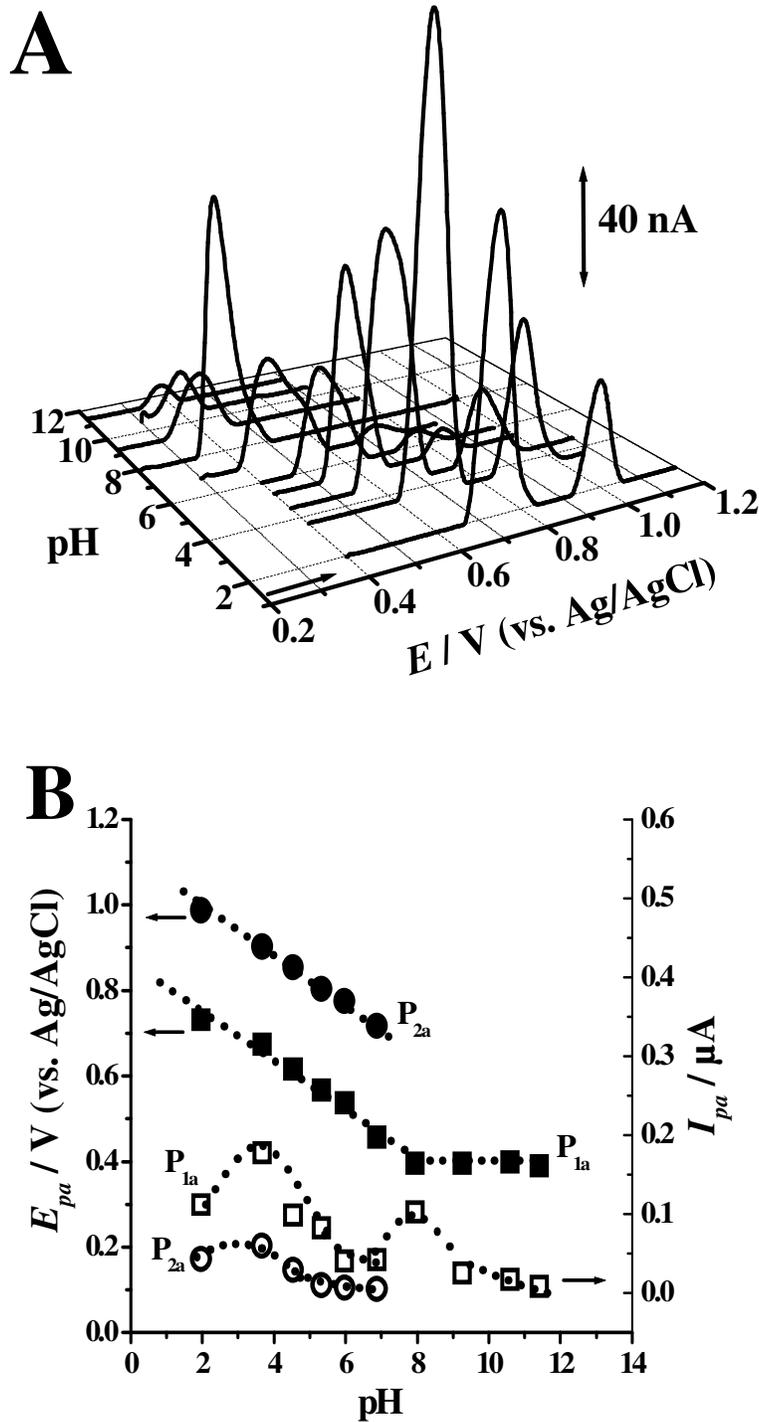


Figura 4.3 (A) voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, obtidos com GCE, numa solução de 2,5 μM de DZ em função do pH. (B) Representação gráfica do pico 1a (■) E_{p1a} e (□) I_{p1a} e do pico 2a (●) E_{p2a} e (○) I_{p2a} em função do pH. O declive da reta pontilhada é 59 mV por unidade de pH.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

A adsorção da DZ na superfície do GCE foi também avaliada por voltametria de DP via dois procedimentos:

Teste 1: sucessivos voltamogramas de DP foram registados numa solução 50 μM de DZ em $\text{pH} = 4,5$ tampão acetato 0,1 M, em seguida o eléctrodo foi lavado com um jato de água desionizada e transferido para o mesmo eletrólito de suporte, $\text{pH} = 4,5$ tampão acetato 0,1 M, na ausência de DZ. Os voltamogramas de impulso diferencial registados mostraram ambos os picos 1a e 2a.

Teste 2: o eléctrodo foi mergulhado numa solução 50 μM de DZ durante 10 min, com diferentes valores de pH , $\text{pH} = 4,5$ tampão acetato 0,1 M, $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1 M e $\text{pH} = 9,0$ tampão NaOH/ $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ 0,1 M e, depois de lavado foi transferido para os mesmos eletrólitos de suporte, na ausência de DZ. Nos voltamogramas de DP registados observou-se que o pico 1a apareceu em meio ácido, com uma intensidade de corrente elevada que continuou elevada nos voltamogramas seguintes.

A influência do pH no comportamento redox da 7-OH-4-CHM também foi avaliada e os voltamogramas de DP registados em soluções de 50 μM 7-OH-4-CHM em diferentes eletrólitos mostraram apenas um pico 1a anódico, irreversível e dependente do pH , cujo potencial se deslocou progressivamente para valores mais negativos com o aumento do pH , **Fig. 4.4A**, e a intensidade de corrente apresentou o valor máximo a $\text{pH} = 2,0$, **Fig. 4.4B**. A adsorção da 7-OH-4-CHM e/ou dos seus produtos de oxidação na superfície do eléctrodo foi significativamente maior em meio ácido.

No intervalo $2,0 < \text{pH} < 8,0$ a dependência do pH é linear, com inclinação de - 59 mV por unidade de pH , por isso o mesmo número de eletrões e prótons estão envolvidos no processo de oxidação da 7-OH-4-CHM, **Fig. 4.4B**, e como a largura a meia altura é $W_{1/2} \sim 100$ mV, a reacção ocorreu com a transferência de um eletrão e de um próton.

Para $\text{pH} > 8,0$ como a 7-OH-4-CHM sofreu desprotonação química nos eletrólitos alcalinos, o pico de oxidação é independente do pH e envolve apenas um eletrão.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

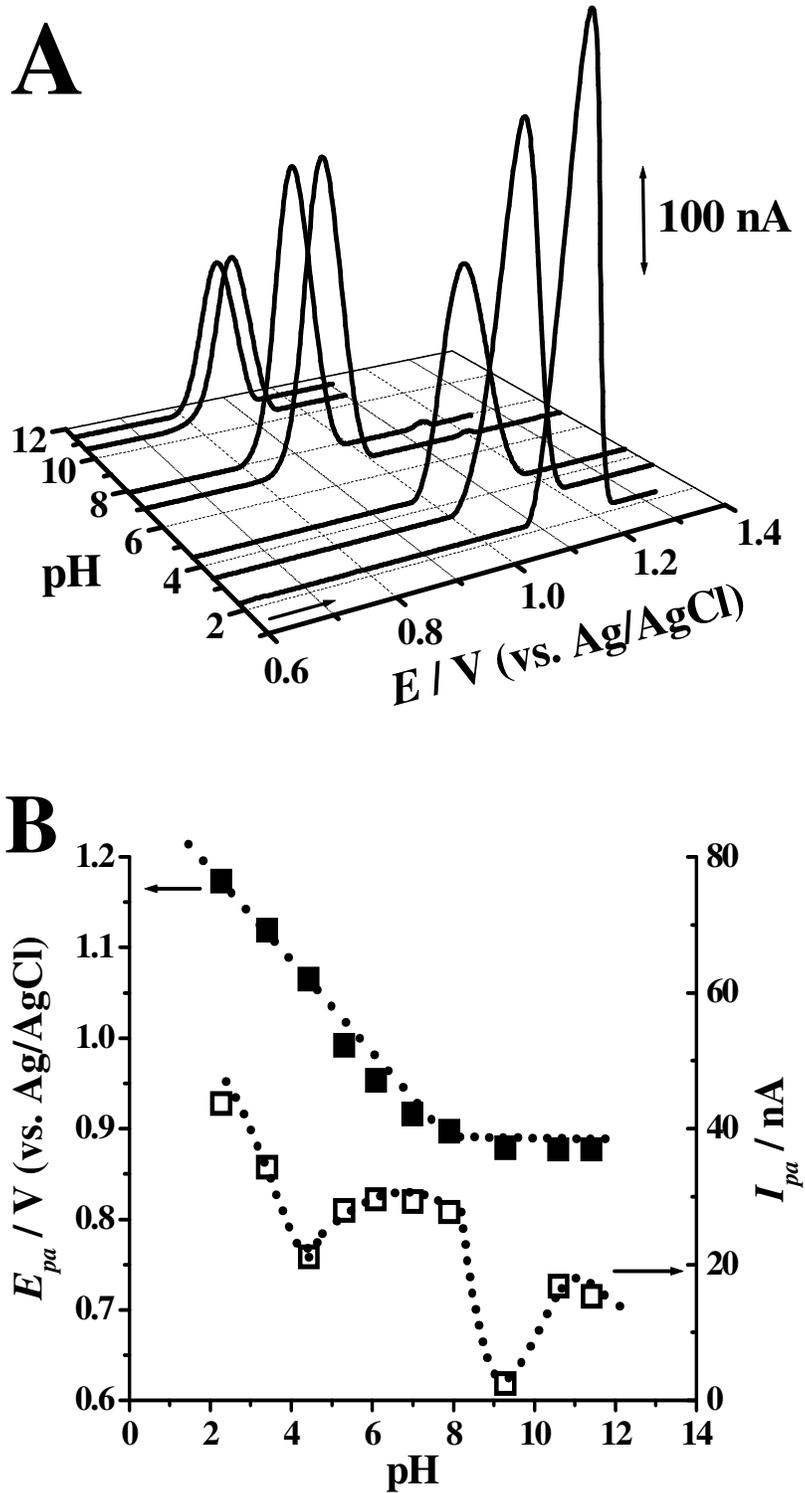


Figura 4.4 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, numa solução de 50 μ M de 7-OH-4-CHM em função do pH. (B) Representação gráfica do pico 1a (\blacksquare) E_{p1a} e (\square) I_{p1a} em função do pH. O declive da reta pontilhada é de - 59 mV por unidade de pH.

4.1.3. Mecanismo de oxidação da DZ e da 7-OH-4-CHM

A molécula de DZ contém dois grupos fenólicos, o grupo 4'-OH no anel B e o grupo 7-OH no anel A enquanto a molécula 7-OH-4-CHM contém apenas o grupo 7-OH do anel A, **Fig. 4.1**. O mecanismo de oxidação para o pico 1a da DZ foi proposto e apresentado na **Fig. 4.6**.

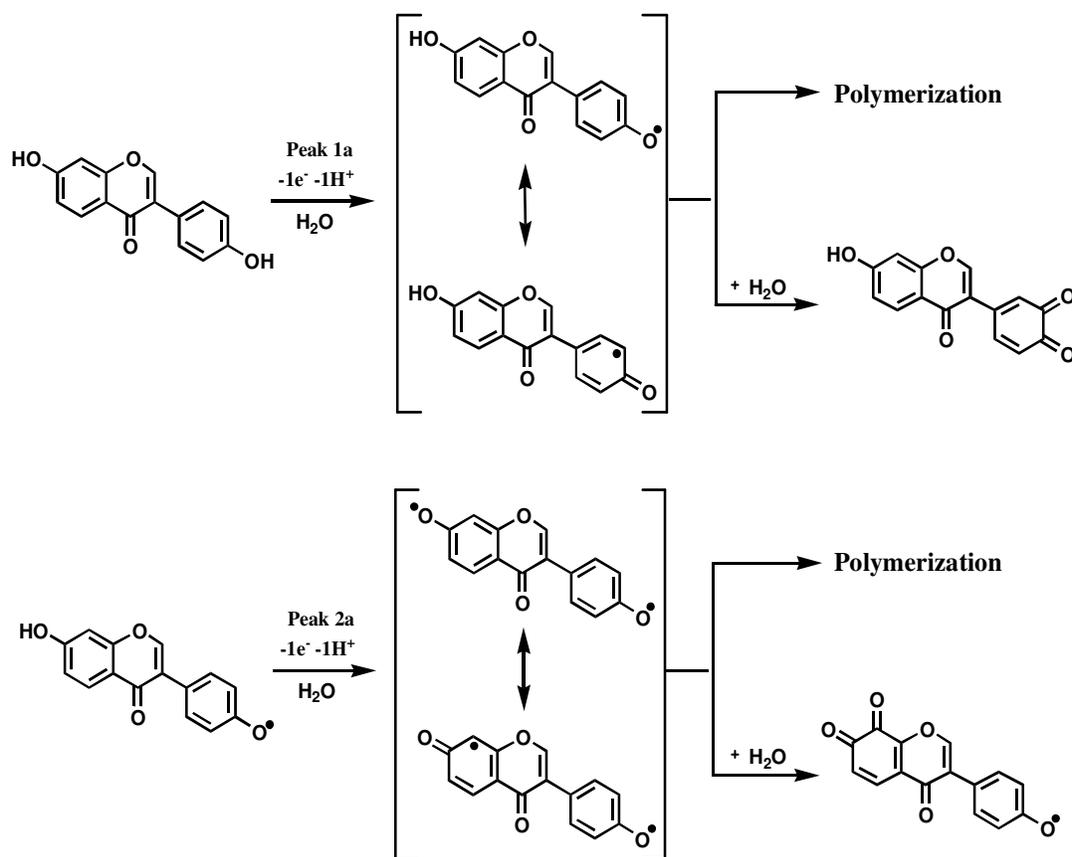


Figura 4.5 Mecanismo de oxidação proposto para a DZ (R = dimerização causando formação de um éster ou acoplamento oxidativo C – C por radicais fenóxido).

O pico 1a da DZ corresponde à oxidação do grupo 4'-OH, enquanto o pico 2a corresponde à oxidação do grupo 7-OH, uma vez que o grupo 4'-OH é mais facilmente oxidado que o grupo 7-OH.

A oxidação dos fenóis, os grupos OH, envolve a formação de um radical fenóxido que, por sua vez, pode iniciar a polimerização levando à formação de produtos

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

que são adsorvidos na superfície do eletrodo. O radical fenóxido formado também pode ser oxidado e formar uma quinona que depois é reduzida reversivelmente.

Com base nos resultados da voltametria de DP e na inclinação do gráfico de Tafel ($\log I$ vs E), dados fornecidos por CV, o mecanismo de oxidação proposto para a DZ está descrito na **Fig. 4.5** e para a 7-OH-4-CHM está descrito na **Fig. 4.6**.

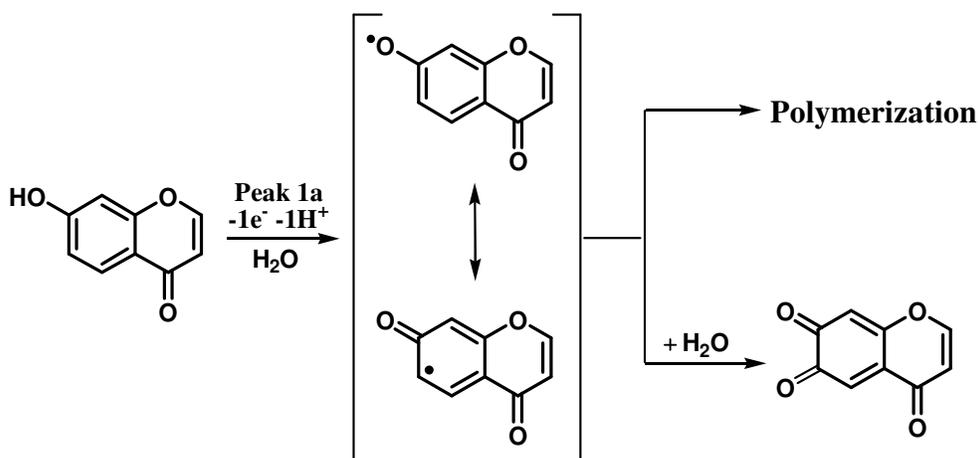


Figura 4.6 Mecanismo de oxidação proposto para 7-OH-4-CHM.

Nas oxidações da DZ e da 7-OH-4-CHM, o mecanismo predominante é a polimerização via reação entre radicais fenóxido seja por ligações éster ou/e acoplamento oxidativo C-C, uma vez que não se observou nenhum pico catódico reversível característico das quinonas nos CVs obtidos nas soluções de DZ e 7-OH-4-CHM.

4.1.4. Determinação analítica

Devido às diversas funções fisiológicas e farmacológicas que a isoflavona DZ possui, a sua determinação qualitativa e quantitativa nos alimentos e em sistemas biológicos é importante e necessária.

Os procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos para a determinação da DZ e da 7-OH-4-CHM representam uma mais-valia uma vez que são técnicas rápidas, relativamente baratas e pouco dependentes do uso de solventes orgânicos.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

Para a determinação eletroanalítica da DZ e da 7-OH-4-CHM escolheu-se o pico de oxidação 1a, **Fig. 4.7**.

O procedimento seguido permitiu obter uma boa linearidade entre as correntes de pico registadas e a respetiva concentração. A superfície do GCE foi sempre polida entre cada medida, de modo a assegurar uma superfície de eletrodo limpa e evitar assim a adsorção dos produtos de oxidação de ambos os compostos. As curvas de calibração foram realizadas com a corrente do pico 1a em função da concentração adicionada, que variou entre 0,0 e 1,25 μM . Para cada concentração foram registadas três medidas.

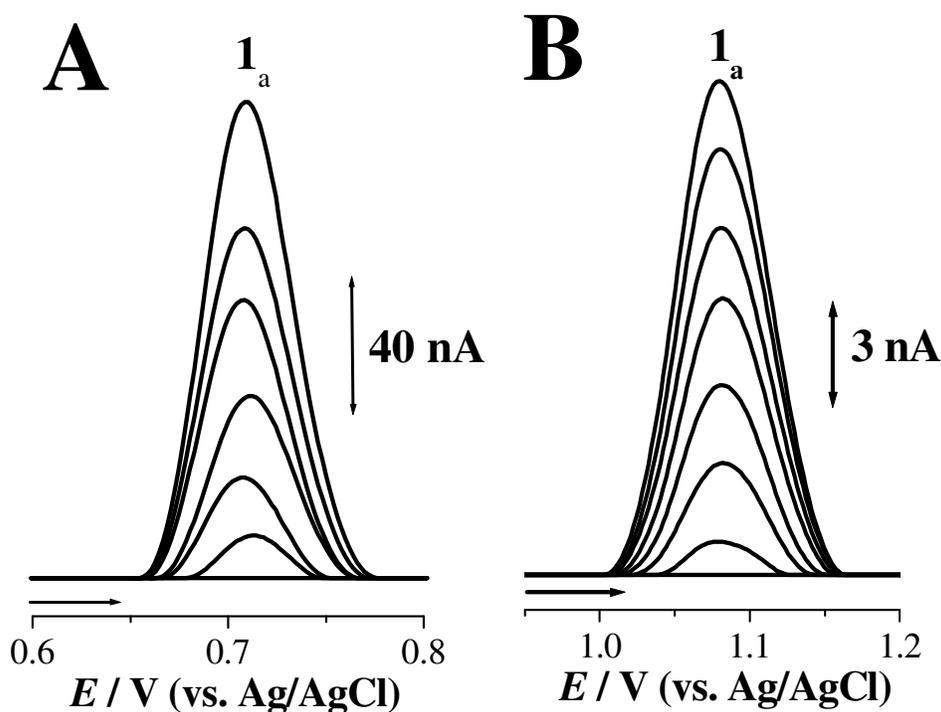


Figura 4.7 (A) Voltamogramas de SW obtidos com um GCE em pH = 4,0, DZ: 0,0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 μM ; (B) voltamogramas de impulso diferencial em pH = 4,5, 7-OH-4-CHM: 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,75, 0,9, 1,1 e 1,25 μM .

Relativamente à DZ, as soluções de diferentes concentrações, foram preparadas diretamente no eletrólito de suporte, em pH = 4,0 tampão acetato 0,1 M e foram registados os voltamogramas de SW, de modo a evitar a adsorção na superfície do GCE, uma vez que a voltametria de SW é mais rápida e sensível, **Fig. 4.7A**.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

A relação linear entre a intensidade de corrente e a concentração foi descrita pela equação:

$$I_{pa} \text{ (A)} = 0,12 [\text{DZ} / \text{mM}] - 1,39 \times 10^{-10}$$

em que $r = 0.998$, $n = 7$, $P < 0.0001$. Os parâmetros determinados foram o desvio padrão, $SD = 3.05 \text{ nM}$ e o limite de detecção, $LOD_{\text{DZ}} = 0,08 \text{ }\mu\text{M}$.

Relativamente à 7-OH-4-CHM, as soluções foram preparadas diretamente em $\text{pH} = 4,5$ tampão acetato $0,1 \text{ M}$ e foram registados os voltamogramas de DP, **Fig.4.7B**.

A relação linear entre a intensidade de corrente e a concentração foi descrita pela equação:

$$I_{pa} \text{ (A)} = 0,012 [7\text{-OH-4-CHM} / \text{mM}] - 9,50 \times 10^{-10}$$

em que $r = 0.995$, $n = 8$, $P < 0.0001$. Os parâmetros determinados foram o desvio padrão, $SD = 0,53 \text{ nM}$ e o limite de detecção, $LOD_{7\text{-OH-4-CHM}} = 0,08 \text{ }\mu\text{M}$.

4.1.5. Determinação dos valores de pK_a por espectrofotometria de UV-vis

Os valores de pK_a para a DZ e para a 7-OH-4-CHM, **Fig. 4.8**, foram determinados para diferentes valores de pH , em soluções aquosas de $0,1\text{M}$ de força iónica, recorrendo à espectrofotometria UV-vis.

A determinação das constantes de ionização depende da determinação direta da razão entre as espécies moleculares e as espécies ionizadas de uma série de soluções tampão não adsorventes, cujo pH é conhecido.

As constantes de pK_a foram determinadas usando a equação Henderson-Hasselbach [157], tendo por base o comprimento de onda onde se observa a maior diferença na absorvância das espécies na solução [158], que no caso da DZ e da 7-OH-4-CHM o valor é 336 nm , **Fig. 4.8**.

Em meio ácido, o espectro da DZ e da 7-OH-4-CHM no intervalo $225\text{-}400 \text{ nm}$ apresentou duas bandas com máximos de absorção a 250 e a 304 nm , **Fig. 4.8A**.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

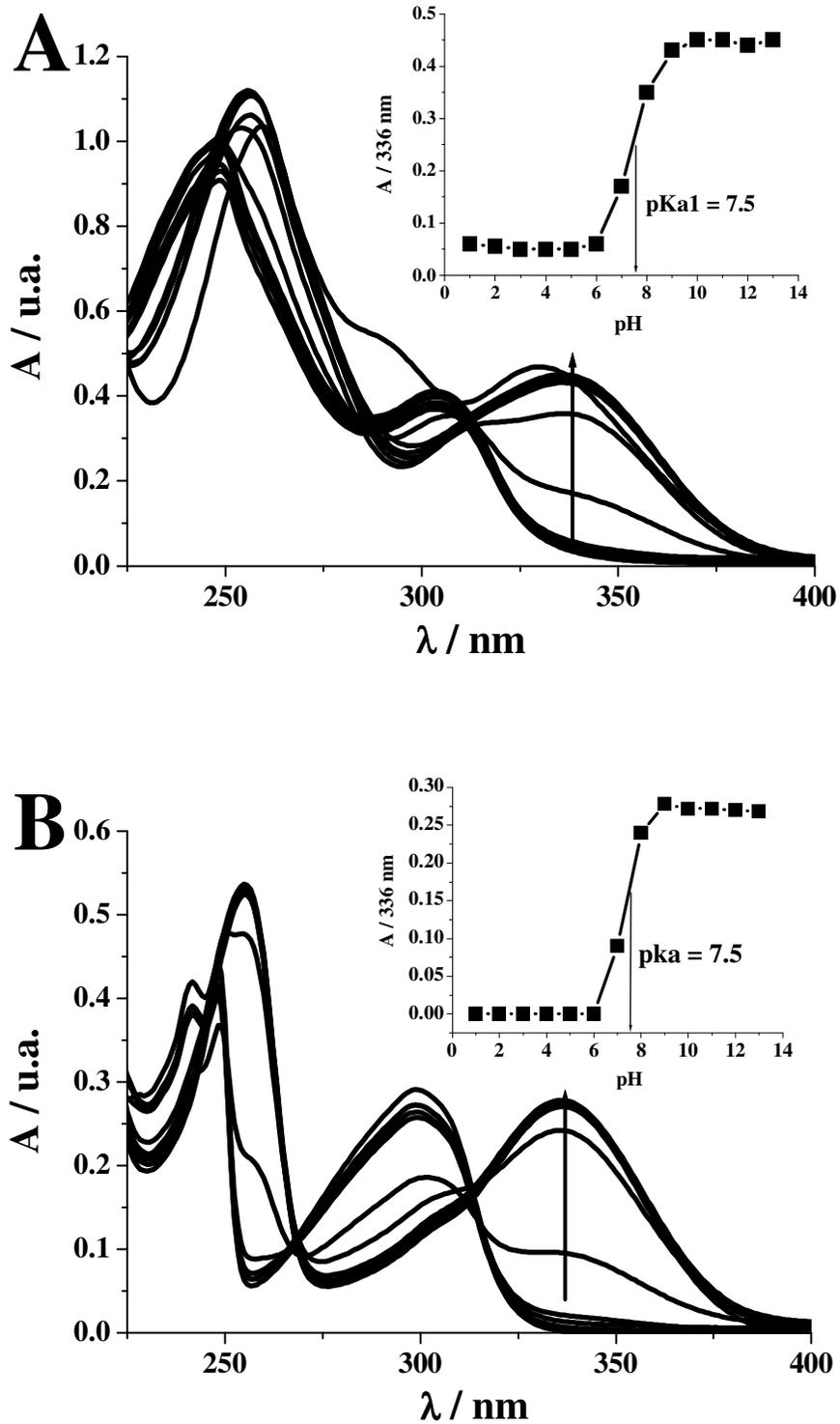


Figura 4.8 Espectros de absorção para diferentes pHs: (A) DZ, (B) 7-OH-4-CHM. A seta dá indicação sobre o sentido do aumento do pH. O gráfico inserido representa a absorção a 336 nm em função do pH.

4. Estudo do Comportamento Anódico dos antioxidantes DZ e 7-OH-4-CHM

Em solução alcalina o espectro da DZ apresenta de novo duas bandas de absorção a 250 e 360 nm e observou-se um desvio para maiores comprimentos de onda. Tendo por base $\lambda = 336$ nm, o valor calculado para a constante de ionização da DZ foi $pK_{a1} = 7,5$, representado no gráfico inserido na **Fig. 4.8A**.

O mesmo comportamento no UV-Vis observou-se para 7-OH-4-CHM e o valor da constante de ionização calculado foi $pK_{a1} = 7,5$, **Fig. 4.8B**. Os resultados obtidos para os compostos estão de acordo com o facto de o grupo 7-OH do anel A ser mais ácido do que o grupo 4-OH do anel B. Os valores determinados para as constantes de ionização da DZ e da 7-OH-4-CHM estão de acordo com a literatura [66,159].

Capítulo 5

Estudo da oxidação do CQ

Neste capítulo descreve-se o comportamento eletroquímico do clioquinol (CQ), **Fig.5.1**, e os processos cinéticos envolvidos na interface eletrodo-solução, para uma vasta gama de pH.

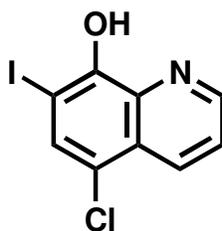


Figura 5.1 Estrutura química do clioquinol.

O CQ é uma molécula quelante ou seja, tem a capacidade de formar complexos com diversos metais. E estudos recentes vão no sentido de desenvolver uma terapêutica alternativa que seja eficaz em doenças relacionadas com o desequilíbrio de metais no organismo, como a doença de Alzheimer, explorando os efeitos neuroprotetivos do clioquinol. Neste contexto, também foi avaliada a capacidade quelante do clioquinol, relativamente aos metais cobre e zinco [8].

Uma vez que o CQ possui uma molécula constituída por um anel fenólico substituído nas posições *orto* e *para*, com átomos halogenados nomeadamente, iodo e cloro, um grupo de compostos fenólicos halogenados com estrutura semelhante à molécula do CQ também foi estudado, com o objetivo de clarificar o mecanismo de oxidação do CQ.

5.1. Estudo do comportamento anódico do Clioquinol

5.1.1. Voltametria cíclica

Inicialmente registaram-se CVs sucessivos numa solução 50 μM de CQ, em $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl 0,1 M, nos quais se observou apenas a formação de um pico anódico, pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,82$ V e após a inversão do sentido do varrimento para direção negativa, um pico catódico, pico 2c, a $E_{p2c} = + 0,60$ V foi detetado, **Fig. 5.2**. O pico 2c corresponde à redução de um produto de oxidação do CQ eletroativo formado durante o processo de oxidação, pico 1a, que ocorre durante o primeiro varrimento na superfície do GCE. A partir do segundo varrimento observou-se um novo pico anódico 2a, a $E_{p2a} = + 0,63$ V, confirmando assim a reversibilidade do pico 2c.

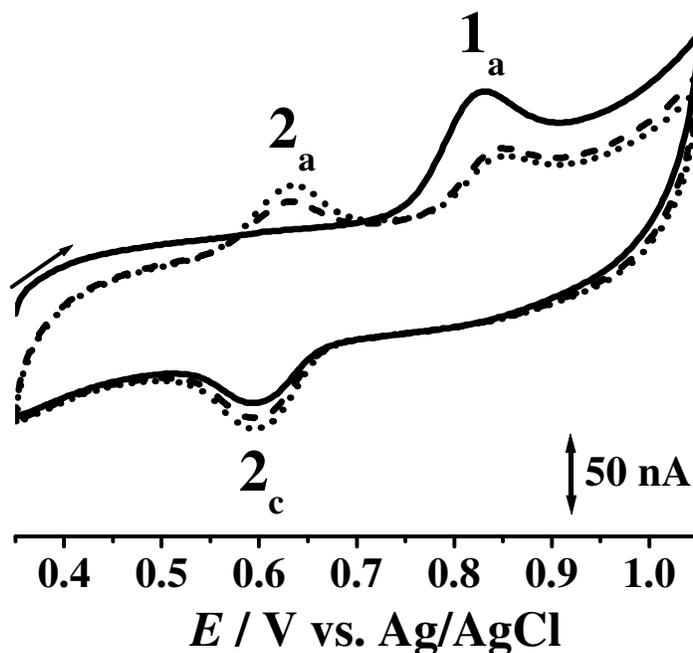


Figura 5.2 CVs obtidos numa solução de 50 μM de CQ, em $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl 0,1 M: (—) primeiro, (---) segundo e (•••) terceiro varrimentos, $v = 100$ mV s^{-1} .

A intensidade de corrente dos picos 2a e 2c é muito próxima e a separação dos picos é ~ 30 mV. Considerando a equação $|E_{pa} - E_{pc}| = 57 / n$, que define uma transferência eletrónica reversível, conclui-se que na oxidação do CQ estão envolvidos dois eletrões numa reação reversível.

5. Estudo do Comportamento Anódico do CQ

A forte adsorção do produto de oxidação do CQ na superfície do GCE causou a passivação da superfície do eletrodo, que aumenta com a concentração da solução de CQ e no intervalo de eletrólitos com $4,0 < \text{pH} < 8,0$.

O efeito da variação da velocidade de varrimento foi também avaliado por CV, em soluções de $50 \mu\text{M}$ preparadas diretamente em $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl $0,1 \text{ M}$. O potencial do pico permaneceu quase inalterado com o aumento da velocidade e obteve-se uma relação linear entre a corrente de pico I_a e o intervalo de velocidades que variou entre 50 e 400 mV s^{-1} . Este tipo de comportamento é específico das substâncias que adsorvem na superfície do eletrodo. Isto poderá ser explicado, tendo em consideração que durante a CV, a quantidade da espécie adsorvida é constante enquanto a quantidade de material que difunde para a superfície do eletrodo varia com o tempo.

O produto de oxidação, o par de picos $2a - 2c$, apresentou um comportamento reversível e controlado por adsorção, o que ficou comprovado pela variação linear da corrente dos picos com a velocidade de varrimento no intervalo de velocidades entre 10 e 300 mV s^{-1} .

5.1.2. Voltametria de Onda Quadrada

Foram feitas experiências de voltametria de SW com a finalidade de melhor caracterizar o comportamento redox do CQ. Para tal, devido aos problemas de adsorção e conseqüente bloqueamento da superfície do eletrodo por parte dos produtos de oxidação do CQ que ocorrem principalmente no intervalo de eletrólitos $4,0 < \text{pH} < 8,0$, as experiências de voltametria de SW foram realizadas numa solução de CQ $10 \mu\text{M}$ a $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl $0,1 \text{ M}$.

Os resultados obtidos por voltametria de SW estiveram de acordo com os resultados da CV, **Fig. 5.3**.

No primeiro varrimento apareceu um único pico de oxidação, o pico $1a$, irreversível, como se pôde verificar através da representação gráfica das componentes direta e inversa, da corrente total obtida no primeiro varrimento, **Fig. 5.3A**.

No segundo varrimento apareceu um novo pico de oxidação, o pico $2a$, correspondente a um produto de oxidação do CQ eletroativo, A reversibilidade desta reação ficou evidenciada pelos picos observados tanto na corrente direta como na inversa, uma vez que as correntes de oxidação e redução são equivalentes, **Fig. 5.3B**.

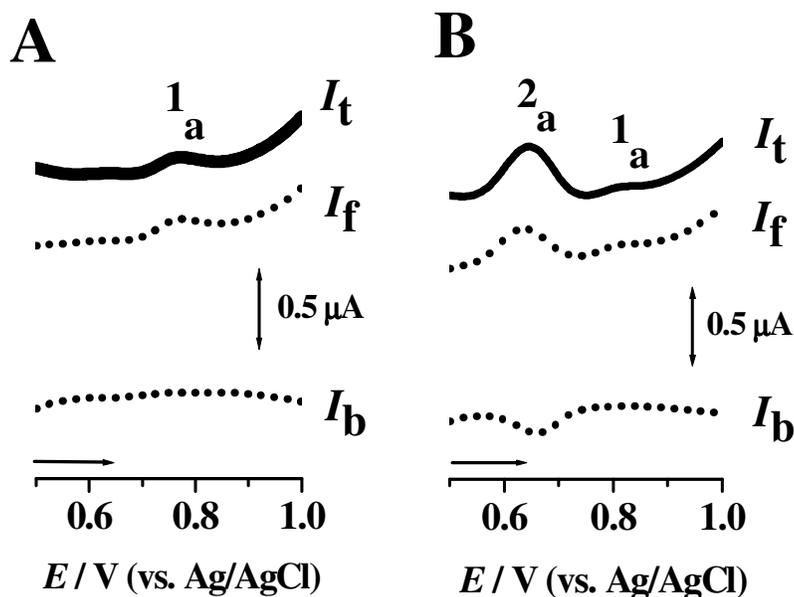


Figura 5.3 Voltamogramas de SW registados numa solução de 10 μM em $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl 0,1 M: (A) primeiro e (B) segundo varrimentos; I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa, $v_{\text{efectiva}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

5.1.3. Voltametria de impulso diferencial de derivados fenólicos

Com o objectivo de esclarecer o mecanismo de oxidação do CQ, foi investigado o comportamento anódico de um grupo de compostos fenólicos halogenados, a fim de avaliar a influência da posição dos halogéneos na oxidação do CQ. Os compostos estudados foram o 2-iodofenol, o 4-iodofenol, o 4-clorofenol, a 8-hidroxiquinolina, a 5,7-diiodoquinolina e a 5,7-cloroquinolina, todos com estruturas semelhante ao CQ, um anel fenólico com substituintes halogenados, iodo e cloro, nas posições *orto* e *para*, **Fig. 5.4**.

Estes resultados eletroquímicos permitiram clarificar qual das posições *orto* ou *para* do CQ seria mais influenciada durante sua oxidação na formação duma quinona, ou seja, qual dos átomos, iodo ou cloro seria substituído para dar lugar à formação de um derivado *orto*- ou *para*-quinona.

Foram registados dois voltamogramas de DP sucessivos, em soluções de 10 μM de cada um dos compostos, preparadas diretamente em eletrólito de suporte, $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1 M. Todos os compostos apresentaram um comportamento

5. Estudo do Comportamento Anódico do CQ

anódico semelhante. A oxidação ocorreu numa única etapa, pico 1a, e no segundo varrimento observou-se o aparecimento de um novo pico de oxidação, pico 2a. Verificou-se uma pequena diferença nos potenciais dos picos dos fenóis em que o grupo substituinte era o iodo e dos fenóis que continham o grupo substituinte cloro, **Tab. 5.1**.

Tabela 5.1 Dados eletroquímicos do grupo de derivados fenólicos substituídos.

Derivados Fenólicos	Potencial / V		
	Scan 1	Scan 2	
2-iodofenol	$E_{p1a} = 0,53$	$E_{p1a} = 0,59$	$E_{p2a} = 0,31$
4-iodofenol	$E_{p1a} = 0,46$	$E_{p1a} = 0,45$	$E_{p2a} = 0,33$
4-clorofenol	$E_{p1a} = 0,63$	$E_{p1a} = 0,63$	$E_{p2a} = 0,40$
8-hidroxiquinolina	$E_{p1a} = 0,48$	$E_{p1a} = 0,50$	$E_{p2a} = 0,30$
5,7-diiodoquinolina	$E_{p1a} = 0,53$	$E_{p1a} = 0,54$	$E_{p2a} = 0,35$
5,7-cloroquinolina	$E_{p1a} = 0,39$	$E_{p1a} = 0,43$	---
clioquinol	$E_{p1a} = 0,49$	$E_{p1a} = 0,53$	$E_{p2a} = 0,34$

A análise dos resultados obtidos relativos à voltametria de DP deste grupo de derivados fenólicos, permitiu afirmar que, uma vez que os resultados apresentados são muito semelhantes entre si e entre os resultados do CQ, estes compostos devem seguir o mesmo tipo de mecanismo de oxidação.

O primeiro passo da oxidação eletroquímica dos fenóis, o pico 1a, envolve a formação do radical fenóxido. De seguida, este radical pode reagir de dois modos distintos: por um lado o radical pode reagir entre si, iniciando a polimerização, e se for este o caso, o produto polimérico obtido pode adsorver fortemente na superfície do GCE causando a sua passivação; noutra mecanismo, o radical é oxidado e dá origem a um produto com grupos quinonas na sua estrutura.

5. Estudo do Comportamento Anódico do CQ

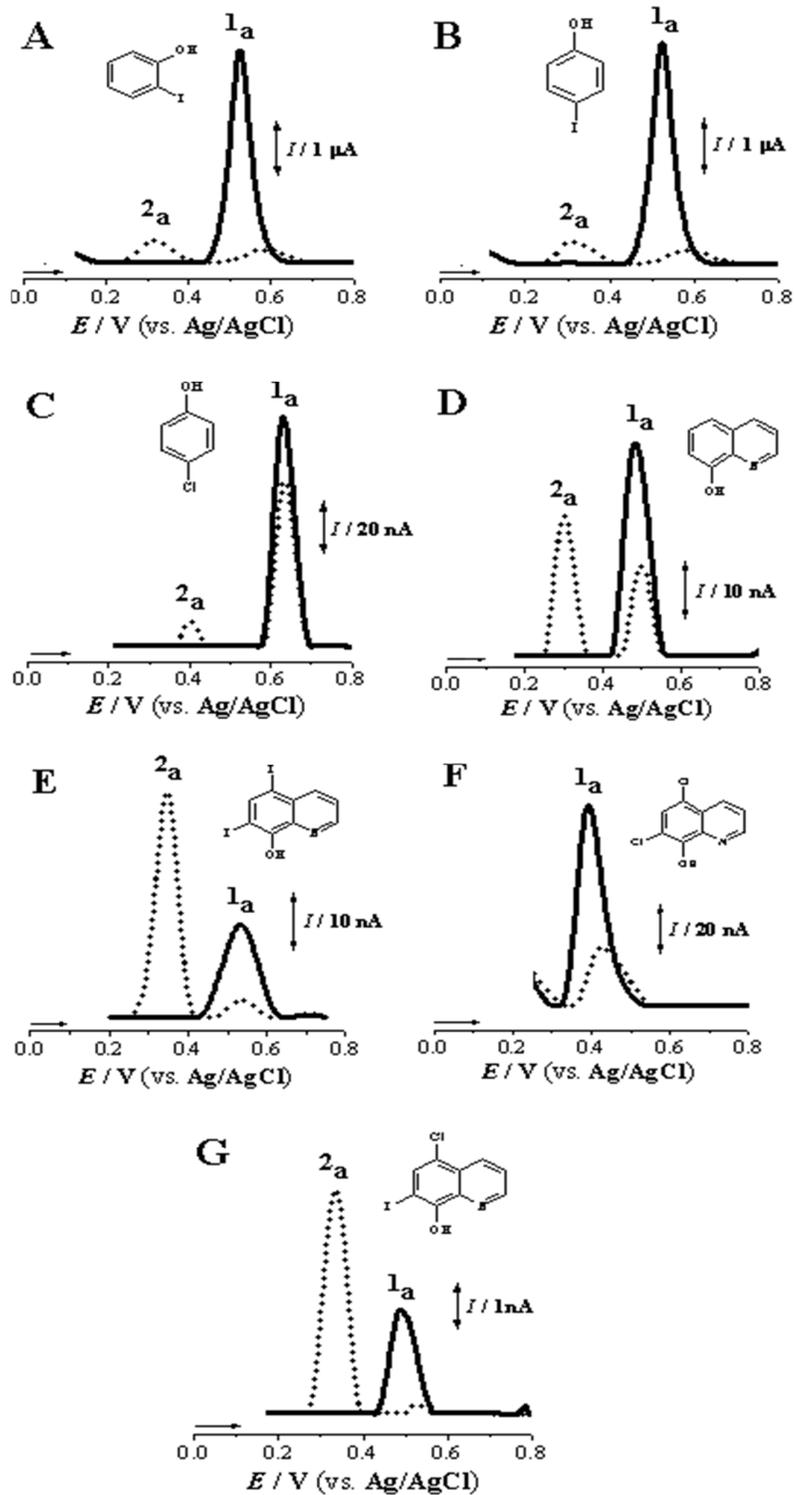


Figura 5.4 Voltamogramas de DP com linha de base corrigida de um grupo de derivados fenólicos substituídos, em pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M): (A) 2-iodofenol; (B) 4-iodofenol; (C) 4-clorofenol; (D) 8-hidroxiquinolina; (E) di-iodo-quinolina; (F) di-cloro-quinolina; (G) clioquinol; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos.

5.1.4. Voltametria de impulso diferencial do CQ; Influência do pH

A influência do pH na oxidação eletroquímica do CQ foi investigada em diferentes eletrólitos de suporte, num intervalo de pH entre 2 e 12 usando a técnica de DPV.

Os voltamogramas foram todos registados em soluções de 5 μM de CQ e em diferentes eletrólitos de força iónica 0,1 M, e em todos os eletrólitos apenas se observou um pico de oxidação, pico 1a, no primeiro varrimento, **Fig. 5.5**.

Para as soluções com $2,0 < \text{pH} < 10,0$, o potencial do pico 1a deslocou-se linearmente para valores de potencial menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 5.5A**. O declive da reta pontilhada é de - 59 mV por unidade de pH, indicando que este mecanismo de oxidação envolve o mesmo número de eletrões e de prótons, **Fig. 5.5B**. Tendo em consideração que em todos os eletrólitos a largura a meia altura do pico foi $W_{1/2} \sim 71$ mV, pode concluir-se que a oxidação do CQ ocorre com a transferência de um eletrão e de um próton.

Para $\text{pH} > 10,0$, o pico anódico 1a é independente do pH, o que indica um mecanismo que apenas envolve um eletrão.

O estudo da influência do pH em diferentes eletrólitos permite a determinação do pK_a do CQ e, de acordo com os resultados, foi determinado $\text{pK}_a \sim 10$, **Fig. 5.5B**.

Foram registados voltamogramas de DP sucessivos, numa solução de 5 μM de CQ em $\text{pH} = 2,1$ tampão KCl/HCl 0,1 M, **Fig. 5.6A**. A oxidação do CQ ocorreu com a formação do pico 1a no primeiro varrimento, a potencial $E_{p1a} = + 0,71$ V. A partir do segundo varrimento de potencial, sem limpar a superfície do GCE, foi detetado o pico 2a, a potencial $E_{p2a} = + 0,59$ V, cuja intensidade de corrente aumentou com os varrimentos sucessivos registados na solução de CQ. Este pico corresponde à oxidação de um produto de oxidação do CQ eletroativo.

A intensidade de corrente do pico 1a diminui com os varrimentos sucessivos registados na solução de CQ, facto que é justificado com a diminuição da área disponível da superfície do GCE devido à forte adsorção do produto da oxidação do CQ, **Fig. 5.6A**.

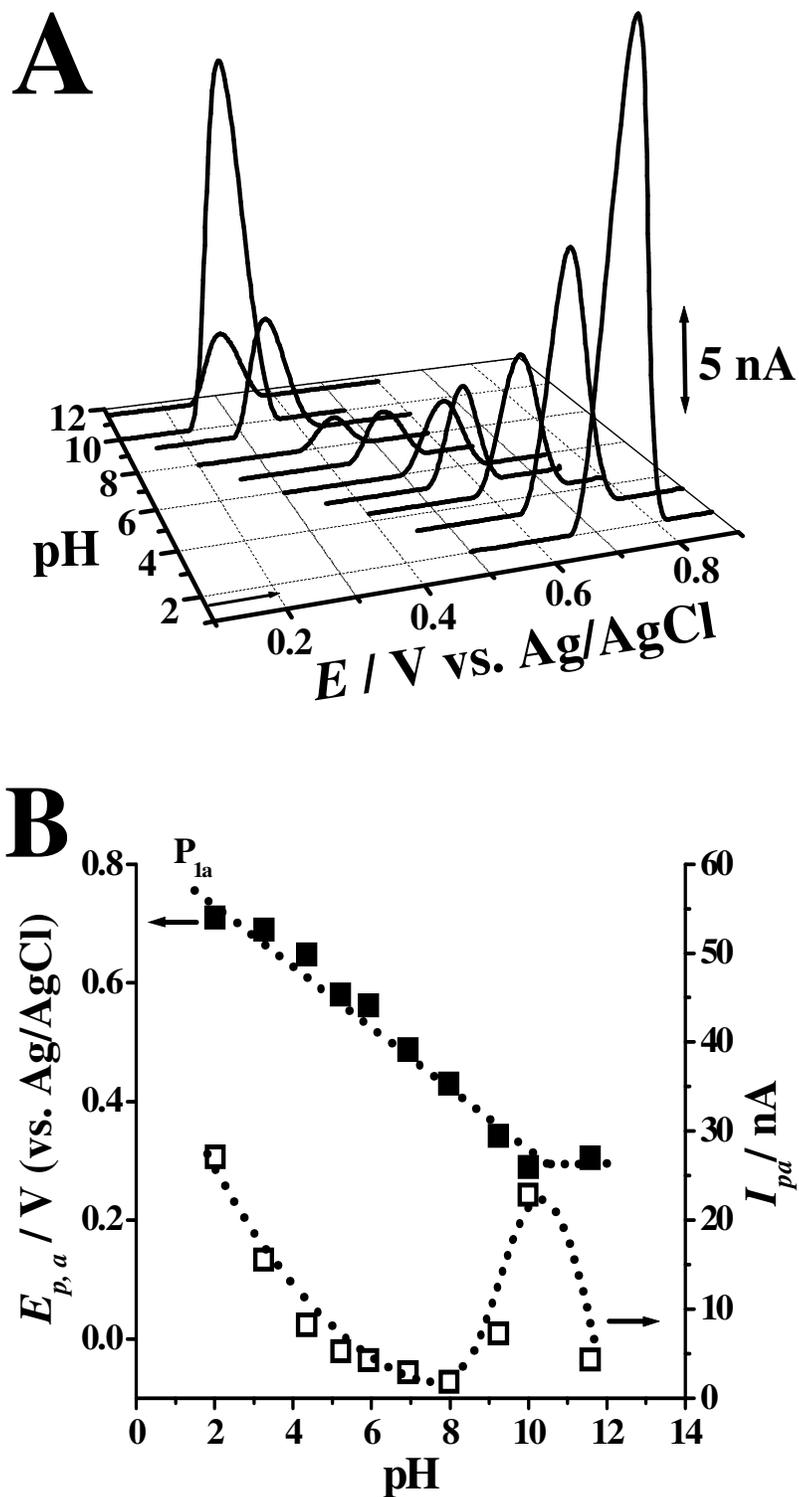


Figura 5.5 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, registados numa solução de 5 μM de CQ, em função do pH. (B) Representação gráfica de (\blacksquare) $E_{p,1a}$ e (\square) $I_{p,1a}$ do pico 1a em função do pH. O declive da reta pontilhada é - 59 mV por unidade de pH.

5. Estudo do Comportamento Anódico do CQ

A forte adsorção do CQ e do seu produto de oxidação na superfície do GCE foi confirmada através de um simples ensaio. Depois de registados vários voltamogramas de DP sucessivos, numa solução de CQ, limpou-se o eléctrodo com um jato de água desionizada e, sem polir, transferiu-se para uma célula com eletrólito de suporte e registaram-se alguns voltamogramas de DP. Os voltamogramas de DP obtidos em eletrólito de suporte mostraram ambos os pico 1a e 2a o que significa que na superfície do GCE existiam algumas moléculas de CQ adsorvidas e também do seu produto de oxidação eletroativo, **Fig. 5.6B**.

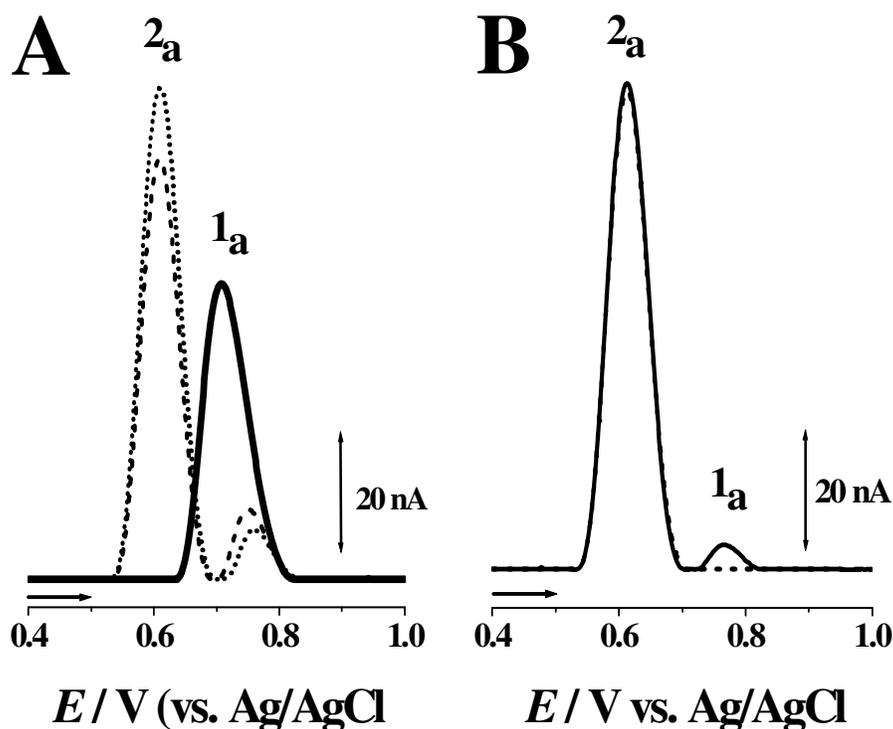


Figura 5.6 Voltamogramas de DP com linha de base corrigida, em $pH = 2,1$ tampão KCl/HCl $0,1 M$: (A) numa solução de $10 \mu M$ de CQ (—) primeiro, (---) segundo e (•••) terceiro varrimentos; (B) em eletrólito de suporte (—) primeiro e (---) segundo varrimentos.

Nos voltamogramas de DP registados em eletrólito de suporte observou-se um ligeiro decréscimo na corrente de pico 2a devido ao consumo do produto adsorvido, enquanto o pico 1a desapareceu depois do primeiro varrimento em eletrólito de suporte.

A influência do pH na oxidação eletroquímica do produto de oxidação do CQ adsorvido na superfície do GCE também foi estudada em diferentes eletrólitos de

5. Estudo do Comportamento Anódico do CQ

suporte, com o pH a variar no intervalo entre 2 e 12, numa solução de 5 μM de CQ, por DPV. Para cada valor de pH foram registados dois varrimentos de potencial sucessivos na solução de CQ. O segundo varrimento de impulso diferencial foi representado graficamente em função do pH, **Fig. 5.6A**. Através da observação das **Fig. 5.5A** e **5.7A**, pode verificar-se que as correntes dos picos 1a e 2a diminuem com o aumento do pH.

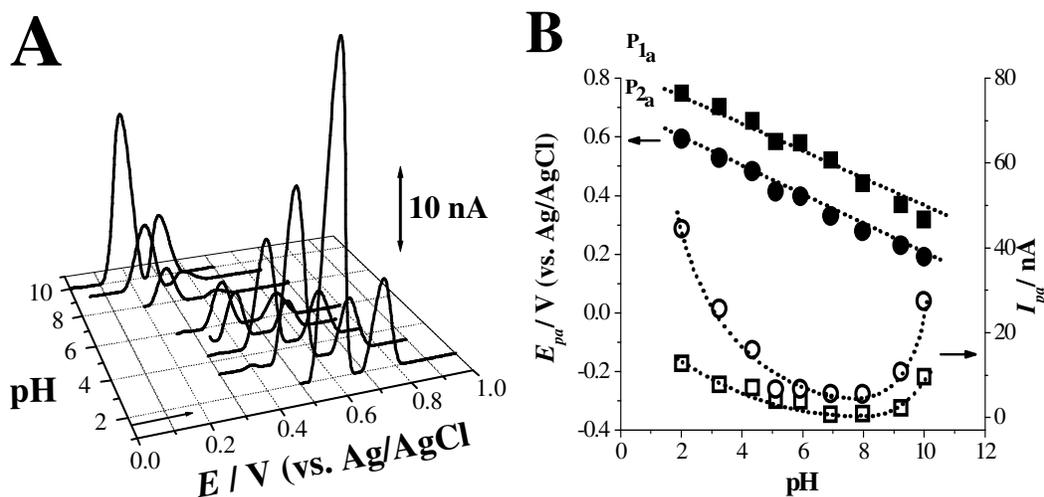


Figura 5.7 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, do segundo varrimento, registados numa solução de 5 μM de CQ, em função do pH. (B) Representação gráfica de (■) $E_{p,a}$ e (□) $I_{p,a}$ do pico 1a e de (●) $E_{p,a}$ e (○) $I_{p,a}$ do pico 2a em função do pH.

O potencial do pico 2a deslocou-se para valores de potencial mais negativos, com o aumento do pH. No gráfico E_{p2a} vs. pH, **Fig. 5.7B**, o declive da linha pontilhada é de - 59 mV por unidade de pH, o que dá indicação de que o mecanismo deste processo de oxidação, pico 2a, em meio aquoso, envolve o mesmo número de eletrões e protões. Tendo em consideração que a largura a meia altura deste pico é $W_{1/2} \sim 60$ mV, pode concluir-se que este processo de oxidação envolve dois eletrões e dois protões, Em concordância com os resultados obtidos por CV.

O mecanismo de oxidação proposto para o CQ está apresentado na **Fig. 5.8**.

Na redução eletroquímica dos pares redox orto-quinona/catecol e para-quinona/hidroquinona, o potencial de redução da para-quinona ocorre para potenciais mais baixos, próximo de 0,0 V e o potencial de redução da orto-quinona ocorre para potenciais mais elevados, variando entre 0,3 V e 0,6 V [160-168].

O potencial do produto de oxidação do CQ, o par 2c – 2a, corresponde à formação de um derivado quinona que, posteriormente sofre uma redução reversível e dá origem a um catecol.

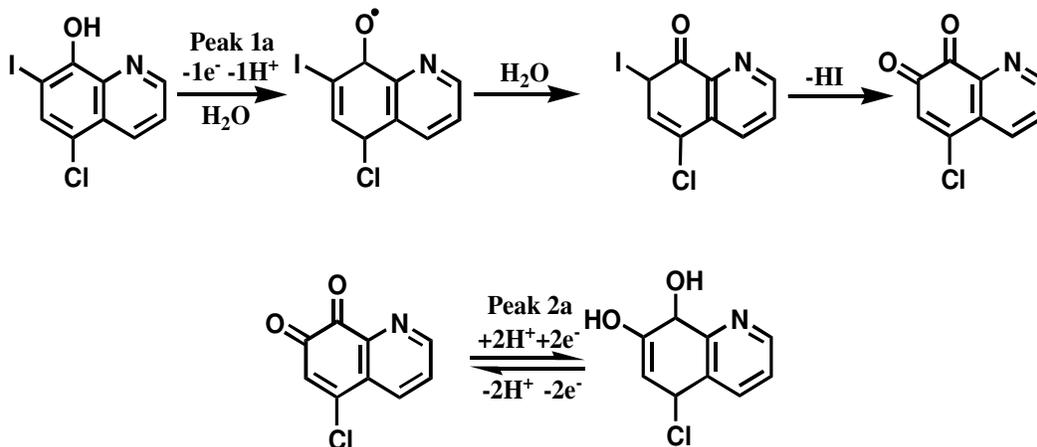


Figura 5.8 Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica do CQ.

Para pHs mais elevado, o mecanismo deve ser idêntico mas quando $\text{pH} > \text{pKa}$ a ionização do CQ ocorre e consequentemente não estão envolvidos prótons na reação.

Além disso como já mencionado anteriormente dependendo do pH da solução e da concentração do CQ o mecanismo da polimerização também deve ser considerado.

5.1.5. Capacidade quelante do CQ

Uma das propriedades estudadas do CQ é a capacidade quelante, ou seja, a capacidade de formar complexos metálicos com espécies como o zinco e cobre que, no caso de pacientes com Alzheimer existe um excesso destes metais nas células das placas senis e na fenda sináptica, característica que é comum a todos os doentes. Alguns estudos já referenciados no capítulo 1.3.1 indicam que o CQ tem a capacidade de formar complexos metaloproteicos, podendo vir a ser útil no tratamento da doença de Alzheimer.

Com o objectivo de verificar se a molécula pode ou não formar complexos metálicos com o zinco e o cobre, foram realizados voltamogramas de DP, da oxidação

do CQ, em pH = 7,5 tampão fosfato 0,1 M, na ausência e na presença de iões de Zn^{2+} e Cu^{2+} , **Fig. 5.9**.

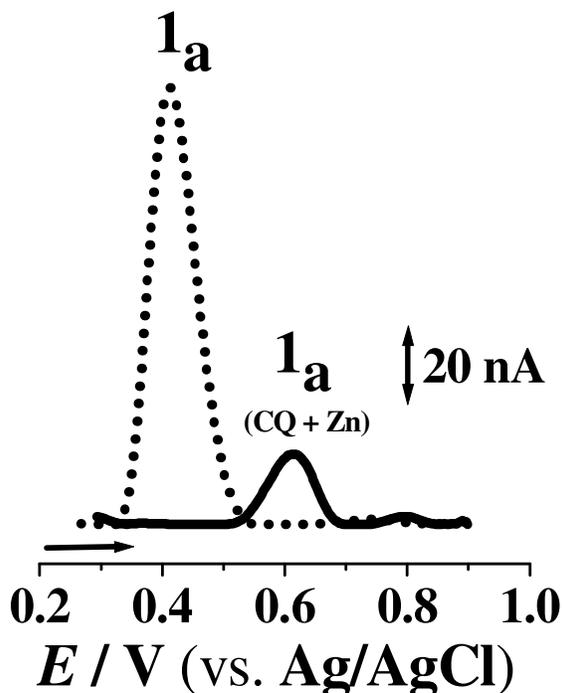


Figura 5.9 Voltamogramas de DP, com correção da linha de base, registados numa solução de 200 μM de CQ, em pH = 7,5 tampão fosfato 0,1 M: (•••) na ausência e (—) na presença de 400 μM de Zn^{2+} .

Depois da adição de 400 μM de Zn^{2+} numa solução de 200 μM de CQ o potencial do pico 1a deslocou-se para valores mais positivos e ocorreu uma diminuição significativa da intensidade de corrente de oxidação referente ao pico 1a. Depois da adição de 200 μM de Cu^{2+} numa solução de 100 μM de CQ, o pico 1a desapareceu completamente, **Fig. 5.9**.

Estes resultados indicam claramente que o CQ possui propriedades quelantes com os metais Zn^{2+} e Cu^{2+} e que o comportamento observado para cada um dos dois complexos formados é diferente.

Capítulo 6

Estudo Redox de um Grupo de Azo-Derivados da Isatina

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados do estudo eletroquímico de uma série de compostos azotados, derivados da isatina (ISA). O estudo foi realizado com um GCE, em diferentes eletrólitos de suporte e as técnicas utilizadas foram a CV, a voltametria de SW e a voltametria de DP [9].

O comportamento eletroquímico da ISA foi investigado e, posteriormente, foi estudada uma série de compostos azo-derivados da ISA, agrupados consoante os grupos substituintes.

Da série estudada fazem parte os compostos azotados, uma vez que contém na sua estrutura um ou mais átomos de nitrogénio, isatina-3-hidrazona, 7-metilisatina-3-hidrazona, isatina-3-semicarbazona, isatina-3-tiosemicarbazona, 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona e 5-nitroisatina.

Consequentemente, as propriedades redox destas moléculas foram esclarecidas e os seus mecanismos de oxidação e redução foram propostos.

6.1. *Estudo do comportamento redox de derivados da isatina*

O estudo inicial realizou-se por CV, com velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, em soluções de concentração $\sim 200 \text{ }\mu\text{M}$, preparadas diretamente em $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ e saturadas com N_2 de forma a evitar a difusão do oxigénio atmosférico para o interior das soluções.

Todos os compostos sujeitos apresentaram comportamento eletroquímico, tendo ocorrido vários picos de oxidação e redução. Uma vez que se verificou que, para todas as moléculas, ambos os processos de oxidação e redução apresentaram comportamentos independentes entre si, eles foram estudados separadamente.

6.2. Oxidação eletroquímica

6.2.1 Voltametria cíclica

As experiências de CV realizaram-se no intervalo de potencial 0,0 V até 1,3 V e em soluções de ~200 μ M, preparadas diretamente em pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M e os dados relativos aos potenciais dos picos de todos os derivados estão resumidos na **Tab. 6.1**.

Tabela 6.1 Potenciais de oxidação dos derivados da ISA obtidos por CV.

Derivados da isatina	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)		
	1º Varrimento	2º Varrimento	
isatina-3-hidrazona	$E_{p1a} = + 0,60$ V $E_{p2a} = + 0,90$ V	$E_{p1a} = + 0,62$ V $E_{p2a} = + 0,92$ V	$E_{p3c} = + 0,25$ V $E_{p3a} = + 0,28$ V
7-metilisatina-3-hidrazona	$E_{p1a} = + 0,64$ V $E_{p2a} = + 0,90$ V	$E_{p1a} = + 0,70$ V $E_{p2a} = + 0,93$ V	$E_{p3c} = + 0,11$ V $E_{p3a} = + 0,32$ V
isatina-3-semicarbazona	$E_{p1a} = + 0,80$ V $E_{p2a} = + 0,94$ V	— $E_{p2a} = + 0,90$ V	$E_{p3c} = + 0,27$ V $E_{p3a} = + 0,30$ V $E_{p4c} = + 0,46$ V $E_{p4a} = + 0,49$ V
isatina-3-tiosemicarbazona	$E_{p1a} = + 0,62$ V $E_{p2a} = + 0,86$ V	— $E_{p2a} = + 0,90$ V	—
5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona	$E_{p1a} = + 0,86$ V $E_{p2a} = + 1,05$ V	— $E_{p2a} = + 0,90$ V	—
5-nitroisatina	$E_{p1a} = + 0,98$ V $E_{p2a} = + 1,10$ V	— $E_{p2a} = + 1,10$ V	—
isatina	$E_{p1a} = + 1,10$ V $E_{p2a} = + 1,24$ V	$E_{p1a} = + 1,16$ V $E_{p2a} = + 1,20$ V	—

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

a) Isatinas-hidrazonas

Os CVs em soluções de 186 μM isatina-3-hidrazona e de 260 μM 7-metilisatina-3-hidrazona estão apresentados na **Fig. 6.1**

Para ambas as hidrazonas, ocorreram dois picos de oxidação irreversíveis e consecutivos, o pico 1a a $E_{p1a} = + 0,60$ V e o pico 2a a $E_{p2a} = + 0,90$ V, associados ao grupo hidrazona das respectivas moléculas, **Fig. 6.1**. Depois de invertido o sentido do varrimento, no sentido negativo dos potenciais, observou-se um pico catódico, pico 3c, a $E_{p3c} = + 0,25$ V, no caso da isatina-3-hidrazona, **Fig. 6.1A**, e o pico 3c, a $E_{p3c} = + 0,11$ V, no caso da 7-metilisatina-3-hidrazona, **Fig. 6.1B**. O pico 3c corresponde à redução do produto de oxidação da isatina-3-hidrazona, formado na superfície do GCE no primeiro varrimento no sentido positivo.

Num novo varrimento, realizado com um GCE limpo, inverteu-se o sentido do varrimento logo após o pico 1a, antes do pico 2a, e não se observou o pico 3c no varrimento inverso, o que significa que o produto de oxidação da isatina-3-hidrazona está associado aos produtos formados no pico 2a, o segundo processo de oxidação.

Depois de realizados alguns CVs sucessivos, sem limpar o eléctrodo entre os varrimentos, verificou-se que o pico 3c é reversível, uma vez que logo no segundo varrimento se observou um novo pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,28$ V. A razão entre as intensidades de corrente dos picos 3a - 3c é muito próximo da unidade e a separação entre os potenciais de ambos os picos é $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 30$ mV.

Considerando que para um sistema reversível, $|E_{pa} - E_{pc}| \sim 59 / n$ mV (a 25 °C), no segundo processo de oxidação da isatina-3-hidrazona estão envolvidos dois electrões. Contudo, na oxidação da 7-metilisatina-3-hidrazona, o pico 3a não é reversível, uma vez que a diferença entre os potenciais do pico é $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 183$ mV, **Fig. 6.1B**.

O estudo do efeito da variação da velocidade foi avaliado numa solução de 186 μM de isatina-3-hidrazona, para velocidades entre 10 e 1000 mV s^{-1} , em pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, **Fig. 6.2B**.

Os resultados demonstraram que a corrente de pico aumenta com o aumento da velocidade. Este tipo de comportamento é justificado devido à forte adsorção da isatina-3-hidrazona e/ou dos seus produtos de oxidação à superfície hidrofóbica do GCE, que está de acordo com o carácter altamente hidrofóbico da ISA [145,169,170].

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

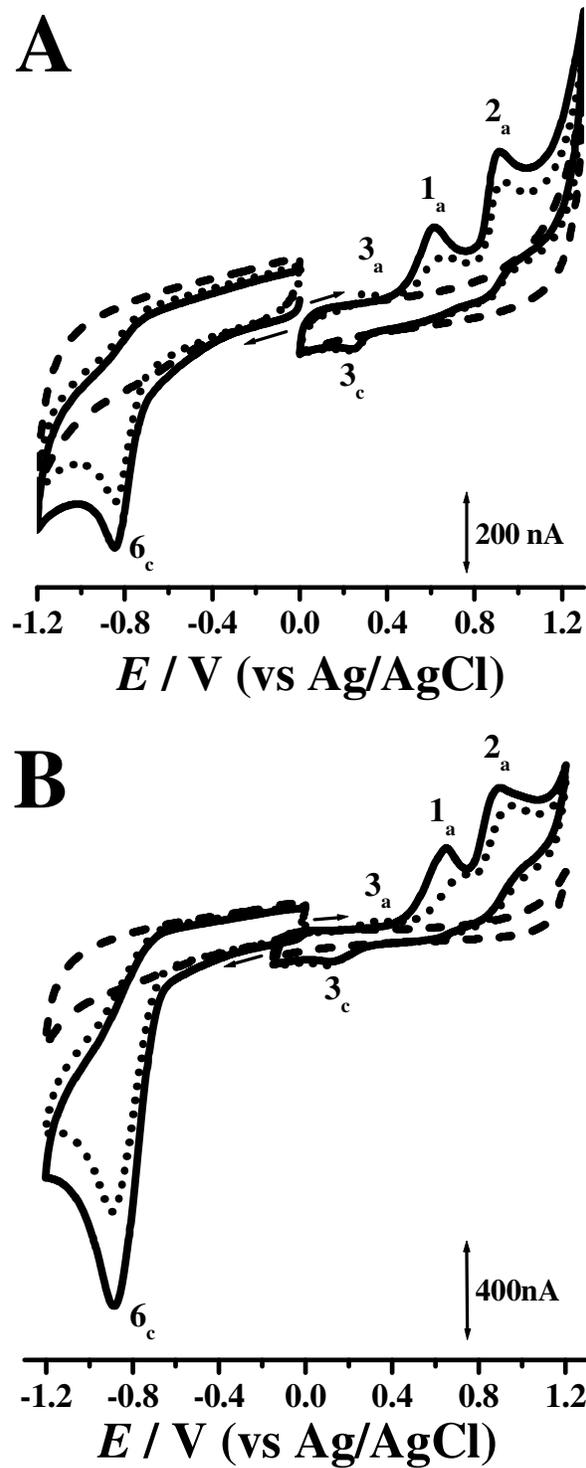


Figura 6.1 CVs em (---) eletrólito de suporte pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M: (A) 186 μM isatina-3-hidrazona e (B) 260 μM 7-metilisatina-3-hidrazona; (—) primeiro e (•••) Segundo varrimento, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

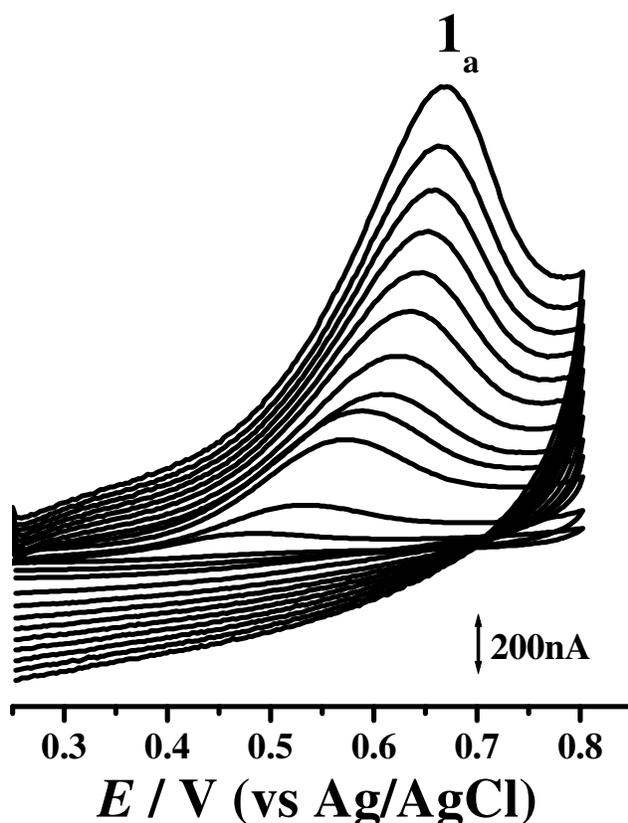


Figura 6.2 CVs numa solução de 186 μM de isatina-3-hidrazona, em $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1 M, com velocidades de varrimento a variar de 10 a 1000 mV s^{-1} .

b) Isatina-semicarbazonas

Os CVs foram registados em soluções de isatina-3-semicarbazona 500 μM e de 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona 167 μM , **Fig. 6.3**.

Relativamente à isatina-3-semicarbazona, observaram-se dois picos de oxidação irreversíveis e consecutivos, no sentido positivo do primeiro varrimento, o pico 1a, a $E_{p1a} = +0,80 \text{ V}$, e o pico 2a, a $E_{p2a} = +0,94 \text{ V}$.

Depois de invertido o sentido do primeiro varrimento em direção negativa, observaram-se dois novos picos catódicos consecutivos, o pico 3c, a $E_{p3c} = +0,27 \text{ V}$ e o pico 4c, a $E_{p4c} = +0,46 \text{ V}$, reversíveis uma vez que a partir do segundo varrimento, sem limpar o GCE, observaram-se dois novos picos de oxidação, os picos 3a e 4a, **Fig. 6.3A** e **Tab. 6.1**. Também se observou a diminuição de corrente dos picos 1a e 2a, devido à forte adsorção dos respetivos produtos de oxidação na superfície do GCE.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

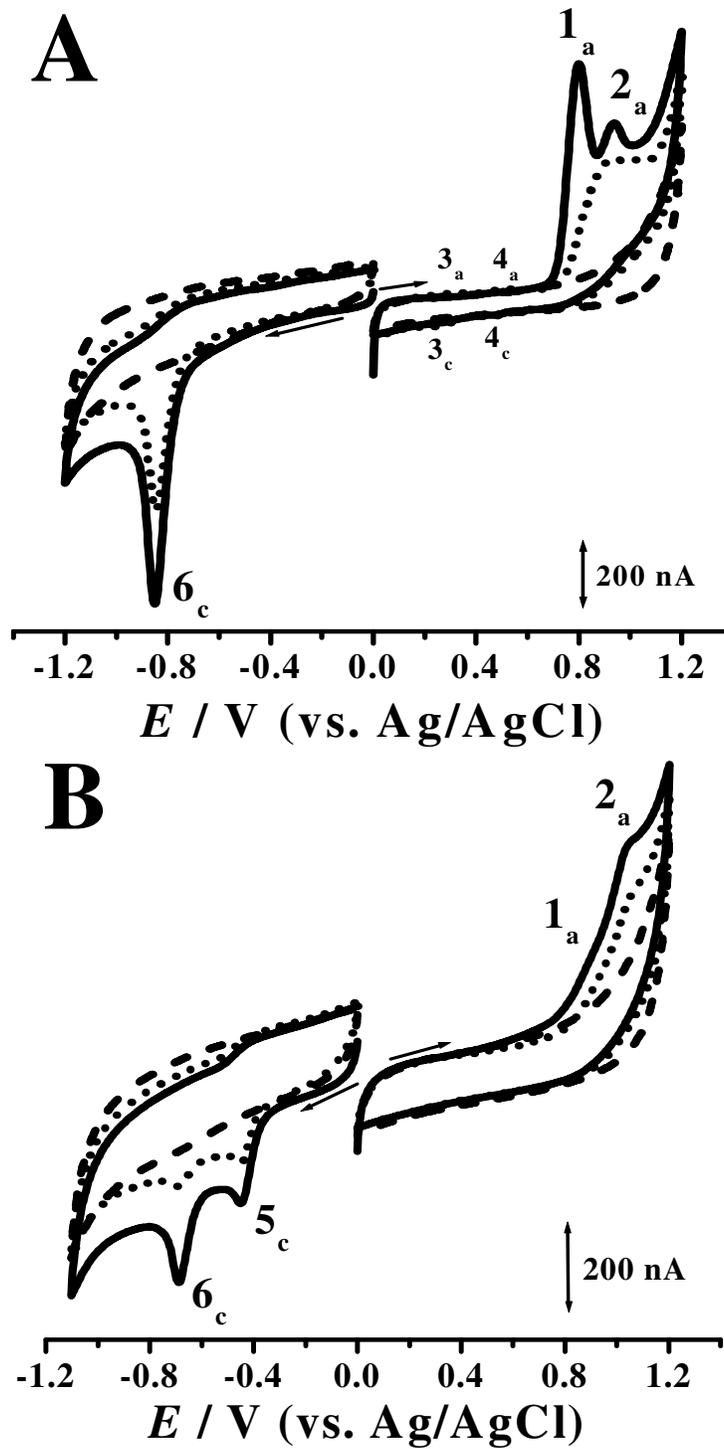


Figura 6.3 CVs em (---) eletrólito de suporte, pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, (A) isatina-3-semicarbazona 500 μ M e (B) 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona 167 μ M; (—) primeiro e (•••) segundo varrimento, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

Nos CVs registados na solução de 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona, observaram-se também dois picos anódicos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,86$ V e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,05$ V, contudo, depois de invertido o sentido do varrimento, não foram detetados quaisquer picos catódicos, indicativos de um processo de redução, **Fig. 6.3B**. No segundo varrimento também se observou a diminuição da corrente dos picos devido à adsorção dos respetivos produtos de oxidação na superfície do GCE.

c) 5-Nitroisatina

Nos CVS registados numa solução de 260 μ M de 5-nitroisatina, em eletrólito de suporte pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, observaram-se dois picos de oxidação irreversíveis, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,98$ V e o pico 2a a potencial $E_{p2a} = + 1,10$ V, **Fig. 6.4A**, mas com a intensidade de corrente muito baixa e os potenciais dos picos apresentaram valores mais positivos, **Tab. 6.1**, quando comparado com os outros derivados da ISA.

d) Isatina

Os CVs numa solução de 500 μ M de ISA, em eletrólito de suporte pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, mostraram no primeiro varrimento o aparecimento de dois picos de oxidação irreversíveis, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,10$ V e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,24$ V, **Fig. 6.4A**. O potencial dos picos deslocou-se para valores de potenciais mais positivos próximo a evolução do oxigénio, quando comparado com os valores de potencial dos picos dos seus derivados, **Tab. 6.1**.

Com o aumento do número de varrimentos sucessivos, sem limpar o GCE, verificou-se que a intensidade corrente para ambos os picos diminui devido à adsorção dos produtos de oxidação da ISA na superfície do GCE.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

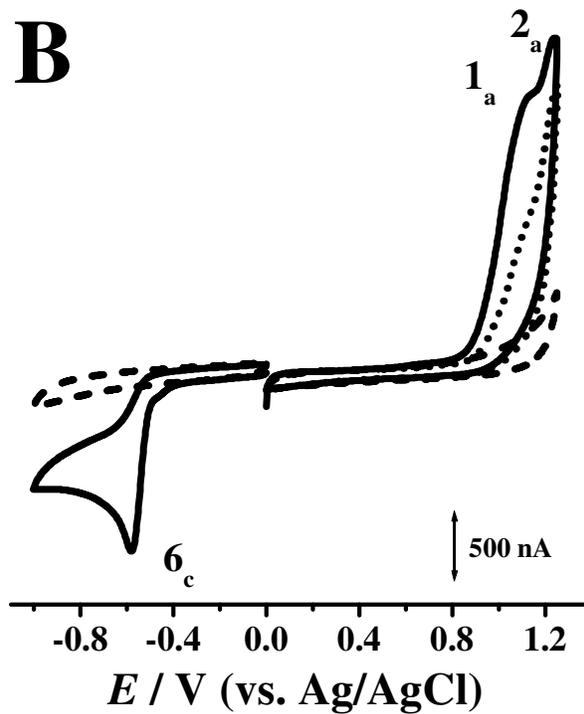
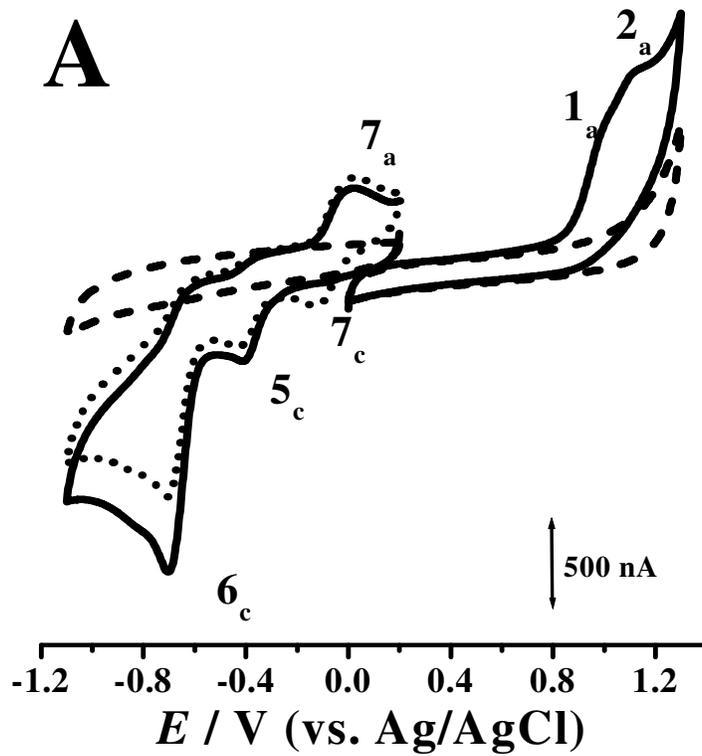


Figura 6.4 CVs registados em (---) eletrólito de suporte, pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, (A) 5-nitroisatina 260 μM e (B) isatina 500 μM ; (—) primeiro e (•••) segundo varrimentos, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

6.2.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

A influência do pH na oxidação eletroquímica da ISA, da isatina-3-hidrazona e da isatina-3-semicarbazona foi estudada em soluções de baixa concentração, usando voltametria de DP, numa gama de eletrólitos de força iónica 0,1 M, num intervalo de pH que variou entre 2,0 e 12,0, **Tab. 2.1**.

a) Isatina-3-hidrazona

Os voltamogramas de DP foram registados numa solução de 10 μM de isatina-3-hidrazona e mostraram que a oxidação ocorre em duas etapas, com a formação dos picos 1a e 2a, **Fig. 6.5A**.

No intervalo entre $2,0 < \text{pH} < 9,0$, o potencial dos picos 1a e 2a desloca-se progressivamente para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 6.5A e B**. O declive da reta pontilhada do gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 6.5B**, é - 59 mV por unidade de pH, o que significa que ambos os mecanismos de oxidação envolvem a transferência do mesmo número de eletrões e protões. O número de eletrões transferidos n , foi determinado pela largura a meia altura dos picos, que é $W_{1/2} \approx 100$ mV para o pico 1a, e $W_{1/2} \approx 78$ mV para o pico 2a, e para ambos os picos, está próximo do valor teórico de 90 mV, o que corresponde à transferência de um eletrão e de um protão.

Também se verificou que o pH influenciou a intensidade de corrente de ambos os picos, principalmente do pico 2a, **Fig. 6.5**, que apresentou uma corrente muito superior no intervalo $2,0 < \text{pH} < 6,0$, e atingiu o valor máximo para $\text{pH} = 3,5$, tampão acetato 0,1 M.

Para $\text{pH} > 9,0$ o potencial de ambos os picos de oxidação é independente do pH, e o mecanismo de oxidação passa a envolver apenas a transferência de um eletrão, uma vez que a isatina-3-hidrazona sofre desprotonação química em eletrólitos alcalinos.

O papel da constante de ionização, pK_a , foi referido na *secção 3.3.2*. Para proceder à medição dos valores de pK_a , é necessário analisar o efeito do analito em eletrólitos de diferentes pHs e acompanhar a variação do potencial em função do estado de ionização da molécula.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

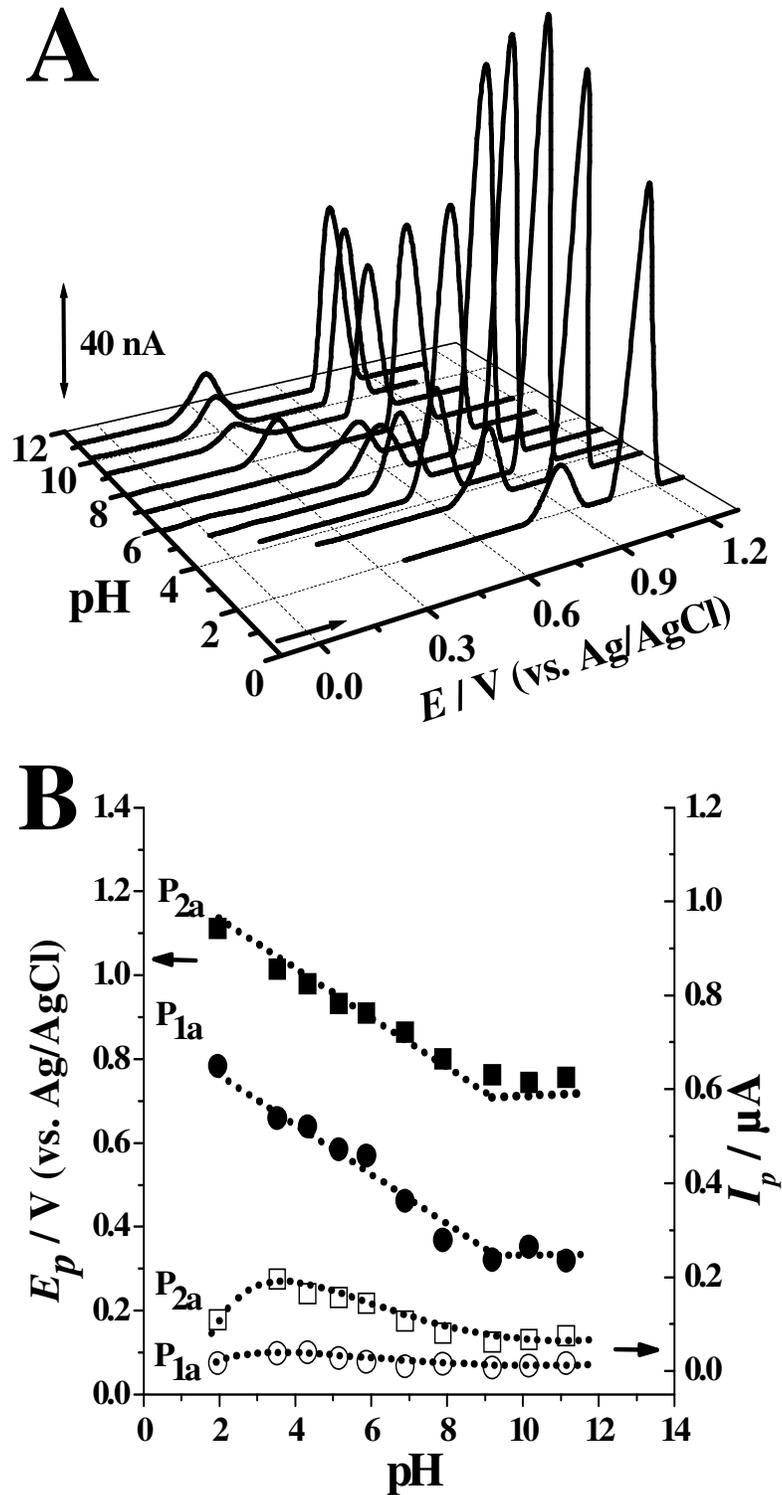


Figura 6.5 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção de linha de base, em soluções de 10 μM de isatina-3-hidrazona, em eletrólitos com diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação de (●) E_{p1a} e da (○) I_{p1a} do pico 1a e (■) E_{p2a} e da (□) I_{p2a} do pico 2a vs. pH. O declive da recta é de - 59 mV por unidade de pH.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

A partir dos dados analisados relativamente à influência do pH na oxidação da isatina-3-hidrazona, **Fig. 6.5B**, o valor do pK_a determinado foi de $pK_a \sim 9$.

Foram também registados voltamogramas de DP sucessivos, numa solução 10 μM de isatina-3-hidrazona, em $\text{pH} = 7,0$, **Figura 6.6**.

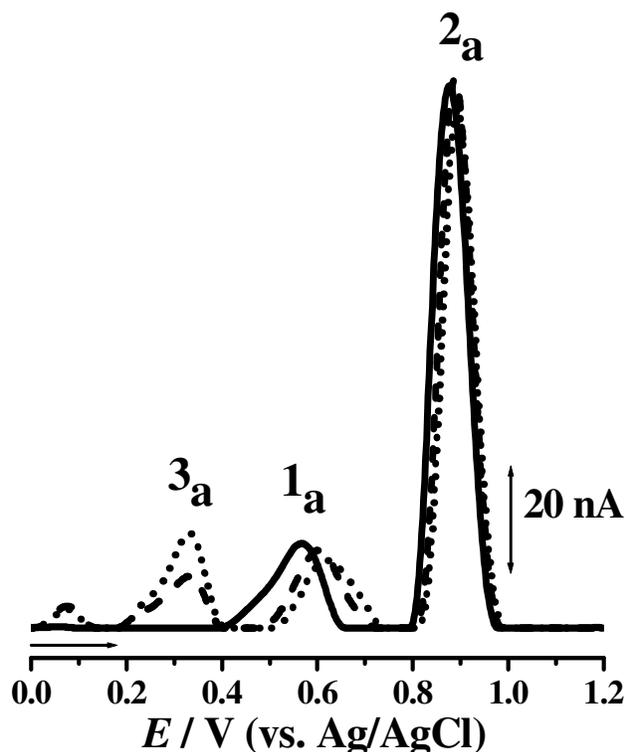


Figura 6.6 Voltamogramas de DP numa solução de 10 μM de isatina-3-hidrazona em $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1 M, (—) primeiro, (---) segundo e (•••) terceiro varrimentos.

No primeiro voltamograma de DP da oxidação eletroquímica da isatina-3-hidrazona, ocorre o pico 1a, a $E_{p1a} = +0,60$ V e o pico 2a, a $E_{p2a} = +0,88$ V. Durante o segundo varrimento, sem limpar a superfície do GCE, observou-se a formação de um novo pico, o pico 3a, a $E_{p3a} = +0,30$ V, cuja intensidade de corrente aumenta com o número de varrimentos. Estes resultados estão de acordo com a CV, **Fig. 6.1A**.

A forte adsorção da isatina-3-hidrazona e dos seus produtos de oxidação na superfície do eléctrodo foi confirmada quando, depois de realizados vários varrimentos sucessivos de voltametria de DP em eletrólito $\text{pH} = 7,0$, sem limpar a superfície do

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

GCE, o eletrodo foi lavado com um jato de água desionizada e transferido logo de seguida para uma célula com eletrólito de suporte apenas **Fig. 6.7**.

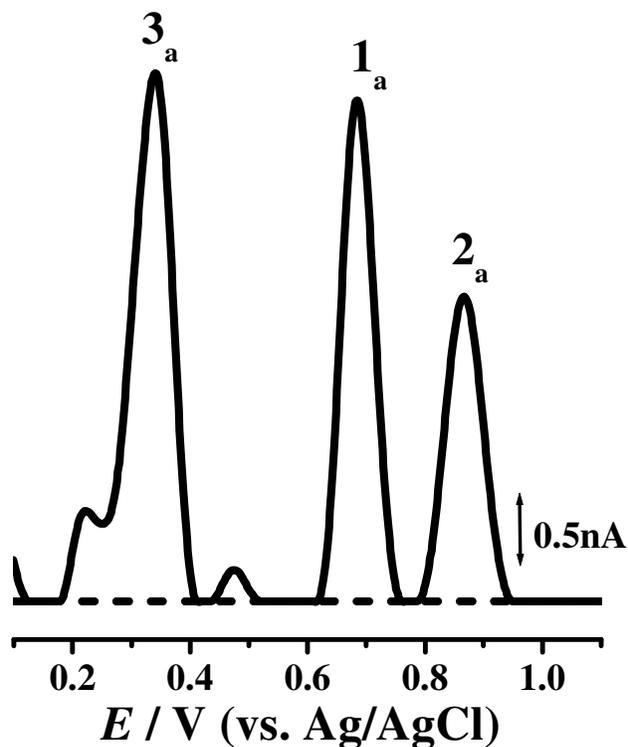


Figura 6.7 Voltamogramas de DP em pH = 7,0: (---) eletrólito de suporte; e (—) isatina-3-hidrazona adsorvida no GCE após quatro varrimentos sucessivos e o eletrodo transferido para o eletrólito de suporte.

Nos voltamogramas de DP de acordo com o procedimento descrito observaram-se os picos 1a, 2a e 3a, **Fig. 6.7**, e este resultado confirmou que tanto a isatina-3-hidrazona como os seus produtos de oxidação adsorvem fortemente na superfície do GCE.

b) Isatina-3-semicarbazona

Nos voltamogramas de DP numa solução de 20 μM de isatina-3-semicarbazona observou-se que a oxidação também ocorre em dois passos, com a formação dos picos 1a e 2a, **Fig. 6.8**.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

No intervalo $3,0 < \text{pH} < 12,0$ verificou-se que, com o aumento do pH, o deslocamento do potencial de ambos os picos 1a e 2a, no sentido dos potenciais mais negativos, **Fig. 6.8A e B**.

O declive da reta pontilhada do gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 6.8B**, é - 59 mV por unidade de pH o que significa que os mecanismos de ambos os processos de oxidação envolvem o mesmo número de elétrons e prótons. Nesta reação ocorre a transferência de um elétron e um próton, uma vez que $W \approx 60$ mV para o pico 1a e $W \approx 75$ mV para o pico 2a.

Também se verificou no gráfico E_{pa} vs. pH, **Fig. 6.8B**, que a intensidade de corrente de ambos os picos é maior no intervalo $2,0 < \text{pH} < 6,0$, atingindo o valor mais alto no eletrólito mais ácido, o que acontece devido ao efeito do pH na ionização do grupo semicarbazona que tem como consequência um aumento da hidrofobicidade e da adsorção na superfície hidrofóbica do GCE.

c) Isatina

Nos voltamogramas de DP numa solução de 50 μM de ISA observou-se o mesmo comportamento, a oxidação ocorre em dois passos, com a formação dos picos 1a e 2a e no intervalo de pH estudado verificou-se que com o aumento do pH, ocorre um deslocamento dos potenciais no sentido dos valores mais negativos, seguindo a relação de 59 mV por unidade de pH, e os mecanismos de ambos os processos de oxidação envolvem a transferência do mesmo número de elétrons e prótons. Uma vez que a largura a meia altura do pico 1a é $W \approx 91$ mV e do pico 2a é $W \approx 98$ mV, nestas reações eletroquímicas ocorre a transferência de um elétron e de um próton.

6.2.3 Voltametria de onda quadrada

Uma das grandes vantagens da SWV é a possibilidade de se observar durante um varrimento se a reação de transferência eletrônica é ou não reversível. Uma vez que se obtém informação relativa à corrente directa e inversa do varrimento, é possível observar os picos de oxidação e de redução das espécies eletroativas na superfície do GCE, durante o mesmo varrimento de potencial.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

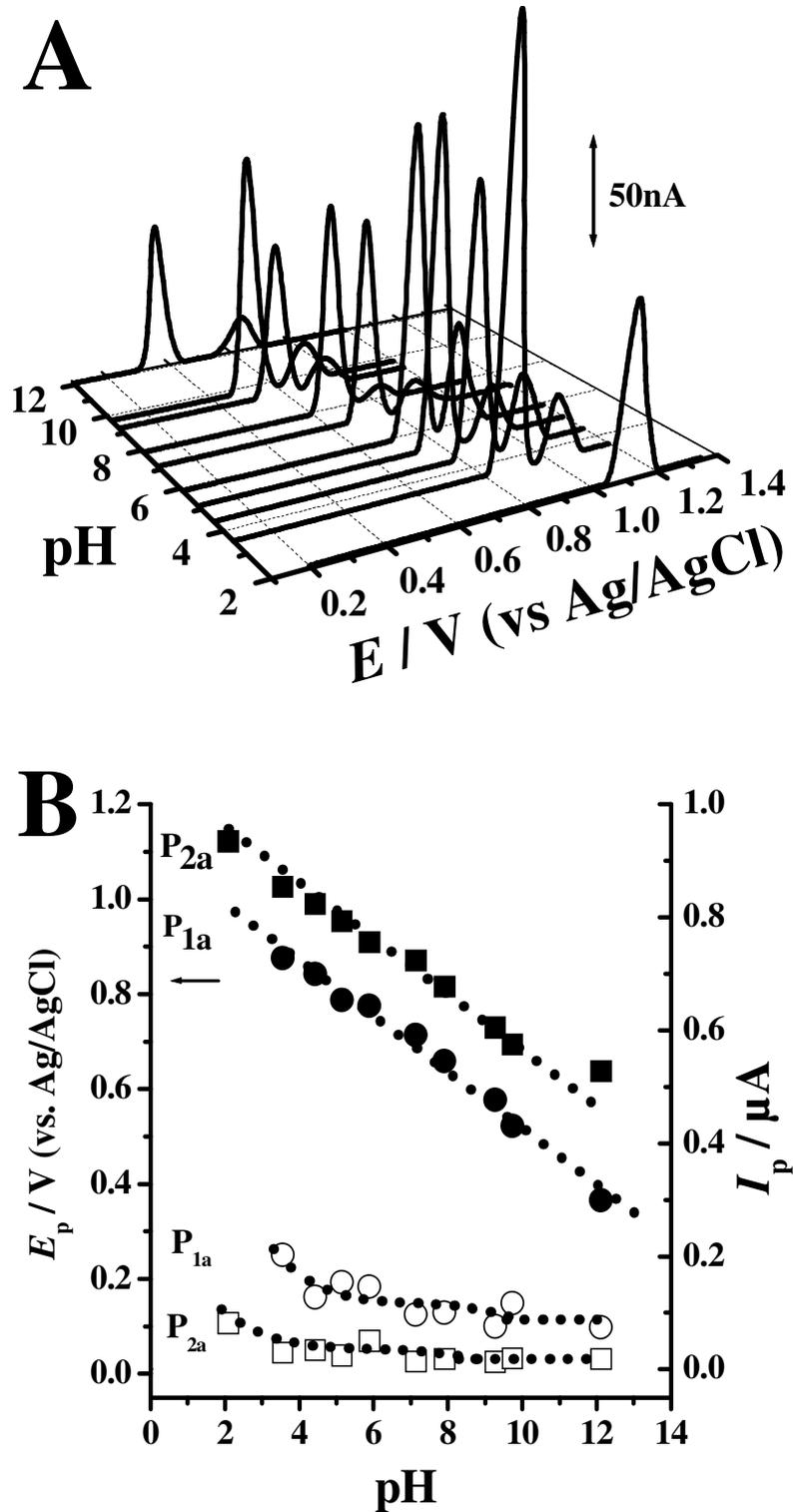


Figura 6.8 (A) Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em soluções de 20 μ M de isatina-3-semicarbazona, em eletrólitos com diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação de (\bullet) E_{p1a} e da (\circ) I_{p1a} do pico 1a e (\blacksquare) E_{p2a} e da (\square) I_{p2a} do pico 2a vs. pH. O declive da reta é de - 59 mV por unidade de pH.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

O comportamento eletroquímico da isatina-3-semicarbazona e da ISA foi avaliado por voltametria de SW, numa solução preparada diretamente a pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, e com uma velocidade efetiva de 100 mV s^{-1} , **Fig. 6.9**.

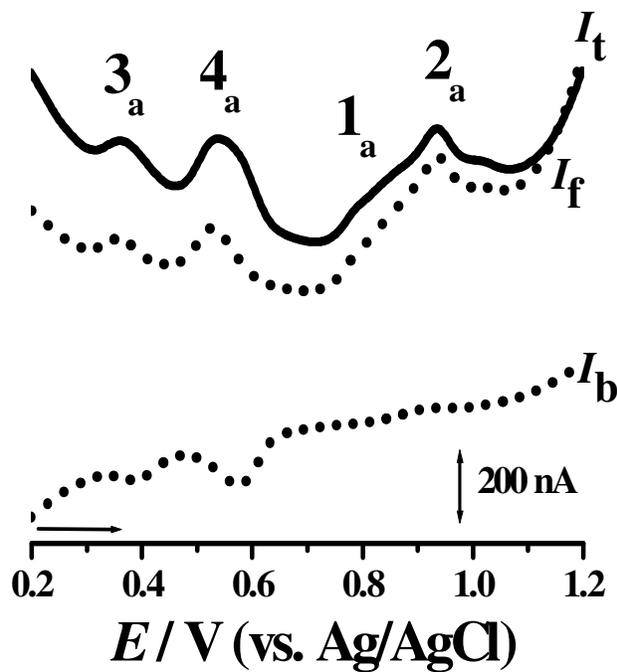


Figura 6.9 Segundo voltamograma de SW, registado numa solução de $20 \mu\text{M}$ de isatina-3-semicarbazona em pH = 6,0, tampão fosfato 0,1 M. I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

No primeiro voltamograma de SW numa solução de $20 \mu\text{M}$ de isatina-3-semicarbazona, observou-se um comportamento semelhante aos resultados da CV e da voltametria de DP, dois picos de oxidação, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,81 \text{ V}$ e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,93 \text{ V}$. A irreversibilidade de ambos os picos ficou demonstrada quando se observou a representação gráfica das componentes directa e inversa da corrente total. No segundo voltamograma de SW observou-se o aparecimento dos novos picos de oxidação, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,36 \text{ V}$, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,54 \text{ V}$, que correspondem aos produtos de oxidação reversíveis da isatina-3-semicarbazona, **Fig. 6.9**, que também foram observados nos resultados obtidos pela CV, **Fig. 6.3A**.

Nos voltamogramas de SW numa solução de $50 \mu\text{M}$ de ISA, observou-se no primeiro varrimento os dois picos de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,98 \text{ V}$, e o pico 2a, a

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

$E_{p2a} = + 1,12$ V, mas no segundo varrimento não se observou nenhum pico de oxidação correspondente ao produto da oxidação da ISA, **Fig. 6.10A**.

Para detetar o produto de oxidação da ISA na superfície do GCE, usou-se um GCE com a superfície limpa, imerso numa solução de 50 μ M de ISA ao qual foi aplicado um potencial de + 1.10 V durante 60 segundos. Este procedimento de condicionamento do eléctrodo vai forçar a oxidação das moléculas da ISA e a adsorção dos seus produtos de oxidação na superfície do GCE.

Contudo, a um potencial tão elevado, os produtos de oxidação da ISA são imediatamente oxidados e o que se observou por voltametria de SW foi um pico muito pequeno, o pico 3a. Os resultados melhoraram quando, imediatamente a seguir ao primeiro condicionamento de 1,10 V, se aplicou outro potencial de + 0,30 V durante 60 segundos. Durante este período os produtos de oxidação da ISA oxidados no primeiro condicionamento são reduzidos e, nos voltamogramas de SW observou-se o pico 3a a $E_{p3a} = + 0,44$ V, **Fig. 6.10B**. A reversibilidade deste pico também foi confirmada com a representação gráfica das componentes direta e inversa da corrente total. Também se observou que as correntes de oxidação e redução do pico 3a são iguais, **Fig. 6.10B**.

6.2.4 *Mecanismos de oxidação*

A ISA e os seus derivados com os grupos funcionais hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona e nitro, apresentam comportamentos de oxidação eletroquímica diferentes entre si e, por esse motivo, para pH fisiológico pH = 7,0, são propostos mecanismos de oxidação para cada molécula, **Fig. 6.11 e 6.12**.

a) **Isatina**

A oxidação da ISA prossegue em dois passos sucessivos que vão provocar alterações no anel benzeno. No primeiro passo, o pico 1a, um electrão é removido do anel benzeno, seguido de desprotonação e ataque nucleofílico direto por parte da água, com a produção da 7-hidroxiisatina. No segundo passo, o pico 2a corresponde à oxidação do grupo 7-OH produzido no primeiro passo da oxidação.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

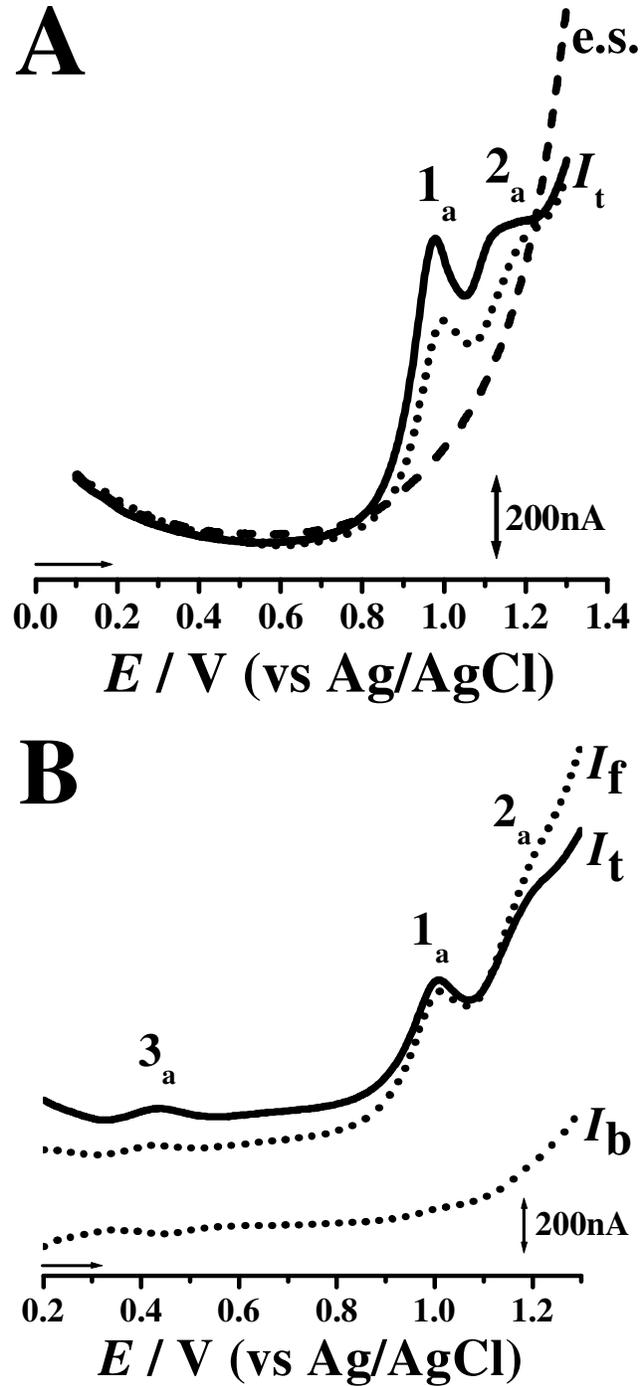


Figura 6.10 Voltamogramas de SW registados numa solução de 50 μM ISA em pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M: (A) sem condicionamento do GCE, (---) eletrólito de suporte (e.s.), (—) primeiro e (•••) segundo varrimento da corrente total; (B) depois do condicionamento do GCE a + 1,10 V durante 60 segundos, seguido de + 0,30 V durante 60 segundos. I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente inversa.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

A oxidação do fenol envolve a formação do radical fenóxido que pode ser oxidado por dois caminhos. Por um lado, o radical fenóxido é oxidado dando origem a uma quinona que é depois reduzida reversivelmente. Por outro lado, o radical fenóxido inicia a polimerização, levando à formação de produtos poliméricos que são depois adsorvidos, provocando o bloqueamento da superfície do GCE. A cinética e o mecanismo de reação relativamente às vias de oxidação e/ou polimerização do radical dependem do pH do meio e da concentração da ISA na solução. O mecanismo de oxidação proposto para a ISA está apresentado na **Fig. 6.11**.

b) Isatina-3-hidrazona e Isatina-3-semicarbazona

O mecanismo de oxidação da isatina-3-hidrazona envolve a transferência de um eletrão e de um próton nos dois passos de oxidação e está associado à oxidação do grupo hidrazona ligado na posição C3, libertando N_2 e dando origem à molécula da ISA, **Fig. 6.12A**. Ao atingir potenciais mais elevados, a ISA produzida também é oxidada, **Fig. 6.11**, obtendo-se assim o processo catódico associado com o pico 3c.

O mecanismo de oxidação da isatina-3-semicarbazona envolve a transferência de um eletrão e um próton de modo que no primeiro passo ocorra a formação do radical livre. O segundo passo envolve a oxidação do radical livre e dá origem a um carbocátion, **Fig. 6.12B**. Tal como na isatina-3-hidrazona, quando são aplicados potenciais mais elevados, o anel benzeno também é oxidado, **Fig. 6.11**, observando-se assim os picos 3c e 4c.

Os grupos funcionais da hidrazona e da semicarbazona levam ao aparecimento de novos processos de oxidação e à ausência dos picos anódicos relativos à molécula da ISA, como observado pela CV, **Fig. 6.1, 6.3 e 6.4**. Um vez que comparando os processos de oxidação desses derivados, os picos 1a e 2a, **Fig. 6.1 e 6.3**, com os picos de oxidação 1a e 2a da ISA, **Fig. 6.4B**, verifica-se que os potenciais se deslocaram para valores menos positivos e que a intensidade de corrente aumentou consideravelmente.

Os grupos hidrazona e semicarbazona ligados à molécula da ISA sofrem oxidação que ocorre a potenciais menos positivos, uma vez que estes grupos doadores de eletrões são mais facilmente oxidados, conseqüentemente têm um poder redutor melhor que o da ISA.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

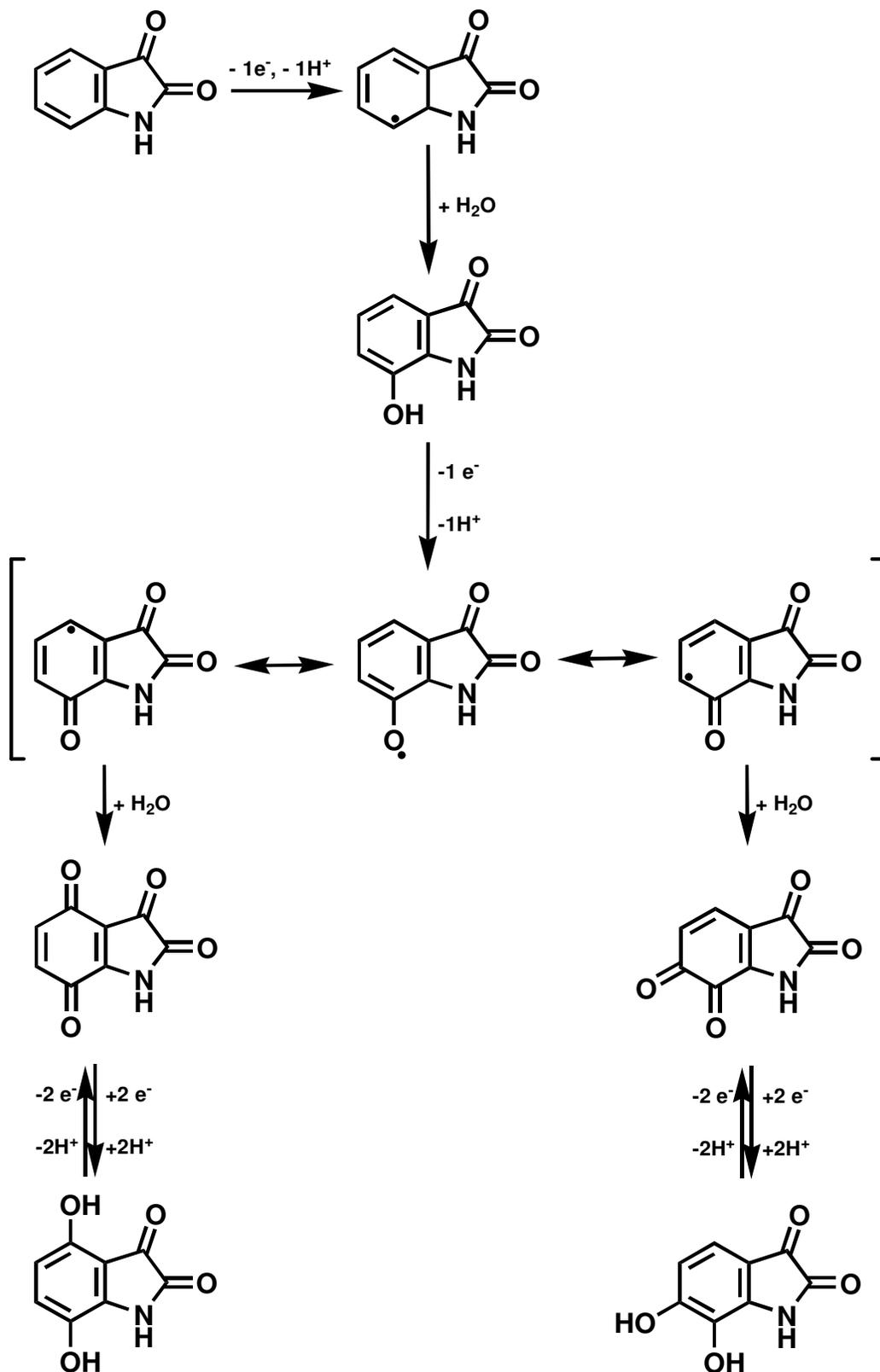


Figura 6.11 Mecanismo de oxidação proposto para a ISA.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

c) 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona

Nos voltamogramas cíclicos de 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona, **Fig. 6.3B**, observaram-se correntes de pico mais baixas, quando comparados com as correntes dos picos de oxidação da ISA, **Fig. 6.4B**. Esta diferença pode ser atribuída ao efeito estérico do bromo ligado à molécula que dificulta a aproximação do grupo semicarbazona à superfície do GCE.

d) 5-Nitroisatina

O comportamento anódico do derivado da ISA que contém o grupo nitro, **Fig. 6.4A**, é diferente de todos os outros derivados mas semelhante a oxidação da ISA, uma vez que tanto neste derivado como na ISA, a oxidação ocorre para potenciais mais elevados e com correntes de pico muito reduzidas e muito semelhantes.

No caso da 5-nitroisatina, a corrente dos picos de oxidação é muito reduzida devido ao efeito de remoção de eletrões causado pelo grupo nitro que torna a molécula de ISA positivamente carregada o que faz com que o seu carácter de dador de eletrões seja menor, por isso é mais difícil oxidar a 5-nitroisatina, o que acontece a potenciais mais levados.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

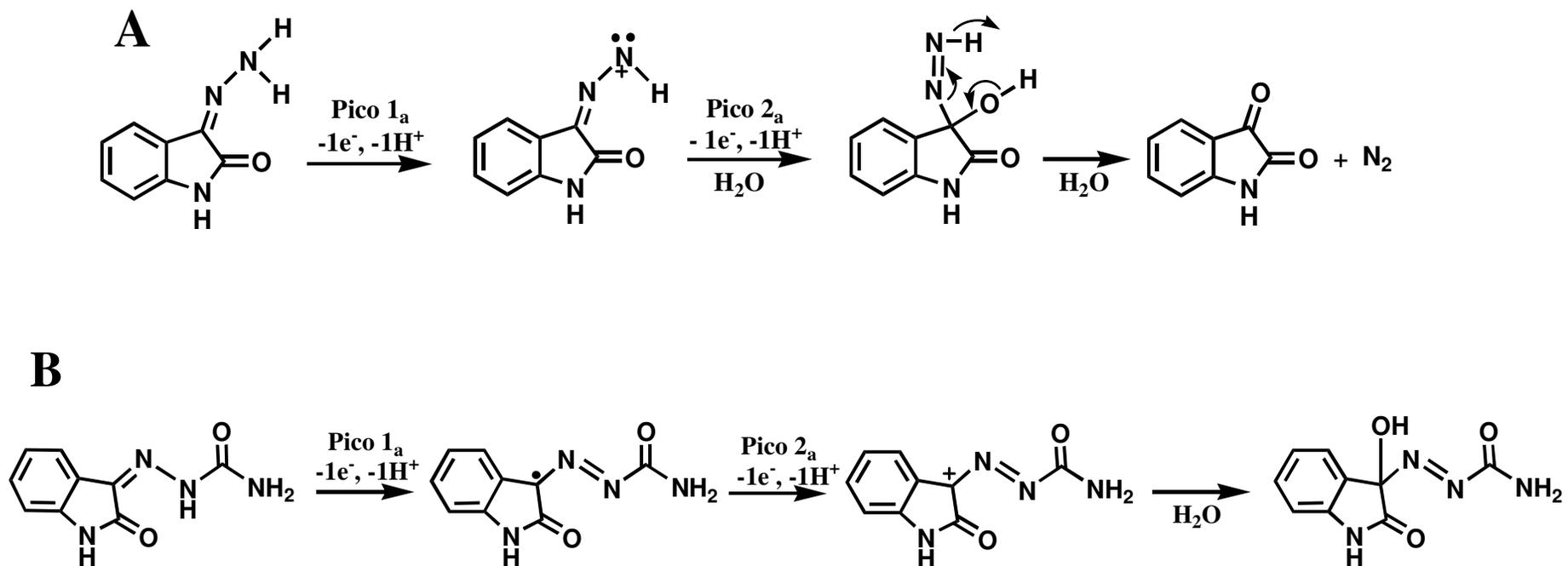


Figura 6.12 Mecanismos de oxidação propostos para: (A) isatina-3-hidrazona e (B) isatina-3-semicarbazona.

6.3. Redução eletroquímica

6.3.1 Voltametria cíclica

Os CVs foram obtidos no intervalo de potencial 0,0 V até -1.2 V, em soluções saturadas de N₂, em pH fisiológico, pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, numa solução de 186 μM de isatina-3-hidrazona, 260 μM de 7-metilisatina-3-hidrazona, 500 μM de isatina-3-semicarbazona e 500 μM de ISA, **Fig. 6.1, 6.3, 6.4 e Tab. 6.2**.

O comportamento observado nos CVs foi idêntico em todas moléculas, com o aparecimento de um pico catódico irreversível, pico 6c, a $E_{p6c} = -0,80$ V, **Tab 6.2**. Contudo, na ISA o pico catódico ocorreu a potenciais menos negativos, $E_{p6c} = -0,58$ V, **Fig. 6.4B e a Tab. 6.2**.

Tabela 6.2 Potenciais de redução dos derivados da ISA obtidos por CV.

Derivados da isatina	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)		
	1ºVarrimento	2ºVarrimento	
isatina-3-hidrazona	$E_{p6c} = -0,85$ V	$E_{p6c} = -0,84$ V	—
7-metilisatina-3-hidrazona	$E_{p6c} = -0,87$ V	$E_{p6c} = -0,89$ V	—
isatina-3-semicarbazona	$E_{p5c} = -0,85$ V	$E_{p5c} = -0,85$ V	—
isatina-3-tiosemicarbazona	$E_{p6c} = -0,77$ V	$E_{p6c} = -0,77$ V	—
5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona	$E_{p5c} = -0,45$ V	$E_{p5c} = -0,44$ V	—
5-nitroisatina	$E_{p5c} = -0,40$ V	$E_{p5c} = -0,40$ V	$E_{p7a} = -0,06$ V
	$E_{p6c} = -0,50$ V	$E_{p6c} = -0,70$ V	$E_{p7c} = -0,09$ V
isatina	$E_{p6c} = -0,58$ V	$E_{p6c} = -0,60$ V	—

O pico 6c na ISA ocorreu devido à redução do grupo carbonil na posição C3 do anel pirrol [134]. O potencial do pico 6c dos derivados hidrazona e semicarbazona, deslocou-se no sentido dos potenciais mais negativos, relativamente ao potencial da

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

ISA, **Fig. 6.1 e 6.3 e Tab. 6.2**. Os mecanismos de redução destes derivados estão associados aos grupos funcionais da posição C3 da ISA, uma vez que tanto a hidrazona como a semicarbazona, são grupos que possuem um forte caráter de doadores de elétrons [152,175].

Os resultados da CV obtidos numa solução de 167 μM de 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona, **Fig. 6.3A e Tab. 6.2**, revelaram dois picos de redução irreversíveis, pico 5c, a $E_{p5c} = -0,45 \text{ V}$ e o pico 6c, a $E_{p6c} = -0,68 \text{ V}$. No segundo varrimento, a corrente dos picos 5c e 6c diminui devido à forte adsorção da 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona e dos seus produtos de redução na superfície do GCE. O pico de redução 5c está associado com a cisão da ligação carbono-bromo na posição C^5 , **Fig. 6.3B**.

Nos CVs numa solução de 260 μM de 5-nitroisatina observaram-se dois picos de redução irreversíveis, o pico 5c a $E_{p5c} = -0,40 \text{ V}$, e o pico 6c, a $E_{p6c} = -0,70 \text{ V}$, **Fig. 6.4A**. Depois de invertido o varrimento, observou-se um novo pico de oxidação, o pico 7a, a $E_{p7a} = -0,06 \text{ V}$, que corresponde à oxidação do produto de redução da 5-nitroisatina, formado na superfície do GCE. Após varrimentos sucessivos por CV, sem limpar a superfície do eletrodo entre os varrimentos, surgiu um novo pico de redução, o pico 7c, a $E_{p7c} = -0,09 \text{ V}$. O aparecimento deste pico veio confirmar a reversibilidade do pico 7a e como as suas correntes de pico são equivalentes e além disso pela diferença de $|E_{p7a} - E_{p7c}| = 30 \text{ mV}$, pode concluir-se que esta reação de redução ocorre com a transferência de dois elétrons, **Fig. 6.4A**.

6.3.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

A influência do pH na redução eletroquímica da isatina-3-hidrazona e da 5-nitroisatina foi avaliada por voltametria de DP, num intervalo de eletrólitos de força iónica 0,1 M, que variou entre $2,0 < \text{pH} < 12,0$, **Tab. 2.1**.

Os voltamogramas de DP registados numa solução de 10 μM de isatina-3-hidrazona, revelaram um processo de redução que ocorre apenas num passo, com a formação de um pico de redução irreversível e dependente do pH, o pico 6c, **Fig. 6.13**. O potencial do pico deslocou-se para valores menos positivos com o aumento do pH, devido à rápida protonação do grupo hidrazona que, como em todos os ácidos conjugados é mais facilmente reduzida do que a base. Também se observou que a

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

corrente do pico 6c é mais elevada em meio ácido, atingindo o valor máximo para $\text{pH} = 2,0$, **Fig. 6.13A**.

No intervalo $2,0 < \text{pH} < 9,0$, a dependência do pH é linear e o declive da reta pontilhada é de -59 mV por unidade de pH , ou seja, estão envolvidos o mesmo número de elétrons e prótons na redução da isatina-3-hidrazona. A largura a meia altura do pico 6c é $W_{1/2} \sim 78 \text{ mV}$, sendo assim, nesta redução ocorre a transferência de um elétron e de um próton, o que está de acordo com os resultados de CV e esta transferência eletrônica vem associada à clivagem da ligação nitrogénio-nitrogénio do grupo funcional hidrazona, **Fig. 6.13B**.

Para $\text{pH} > 9,0$, a redução da isatina-3-hidrazona é independente do pH , ou seja, a reação passa a envolver apenas a transferência de um elétron, tal como indicam os resultados de CV, **Fig. 6.13B**.

Nos voltamogramas de DP numa solução de $20 \mu\text{M}$ de 5-nitroisatina observou-se que o processo de redução ocorre em dois passos, com a formação dos picos 5c e 6c, **Fig. 6.14A**.

O pico 5c corresponde à redução do grupo nitro ligado à molécula da ISA. No intervalo $2,0 < \text{pH} \leq 10,0$, com o aumento do pH , os potenciais de pico deslocam-se no sentido dos valores menos positivos, **Fig. 6.14A e B**. A reta pontilhada do gráfico E_{p5c} vs. pH tem um declive de -59 mV por unidade de pH ou seja, este mecanismo envolve o mesmo número de elétrons e prótons. A largura a meia altura do pico 5c é $W_{1/2} \sim 77 \text{ mV}$, por isso este processo de redução envolve a transferência de um elétron e de um próton.

Aumentando o pH no intervalo $2,0 < \text{pH} < 10,0$, o potencial do pico 6c desloca-se no sentido dos valores menos positivos, **Fig. 6.14A**. A reta pontilhada do gráfico E_{p6c} vs. pH também tem um declive de -59 mV por unidade de pH , ou seja, esta reação envolve igualmente o mesmo número de elétrons e prótons. Como a largura a meia altura do pico 6c é $W_{1/2} \sim 82 \text{ mV}$, a reação envolve a transferência de um próton e de um elétron.

Para $\text{pH} \geq 10$, o pico de redução é independente do pH o que significa que o mecanismo envolve apenas a transferência de um elétron, **Fig. 6.14B**.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

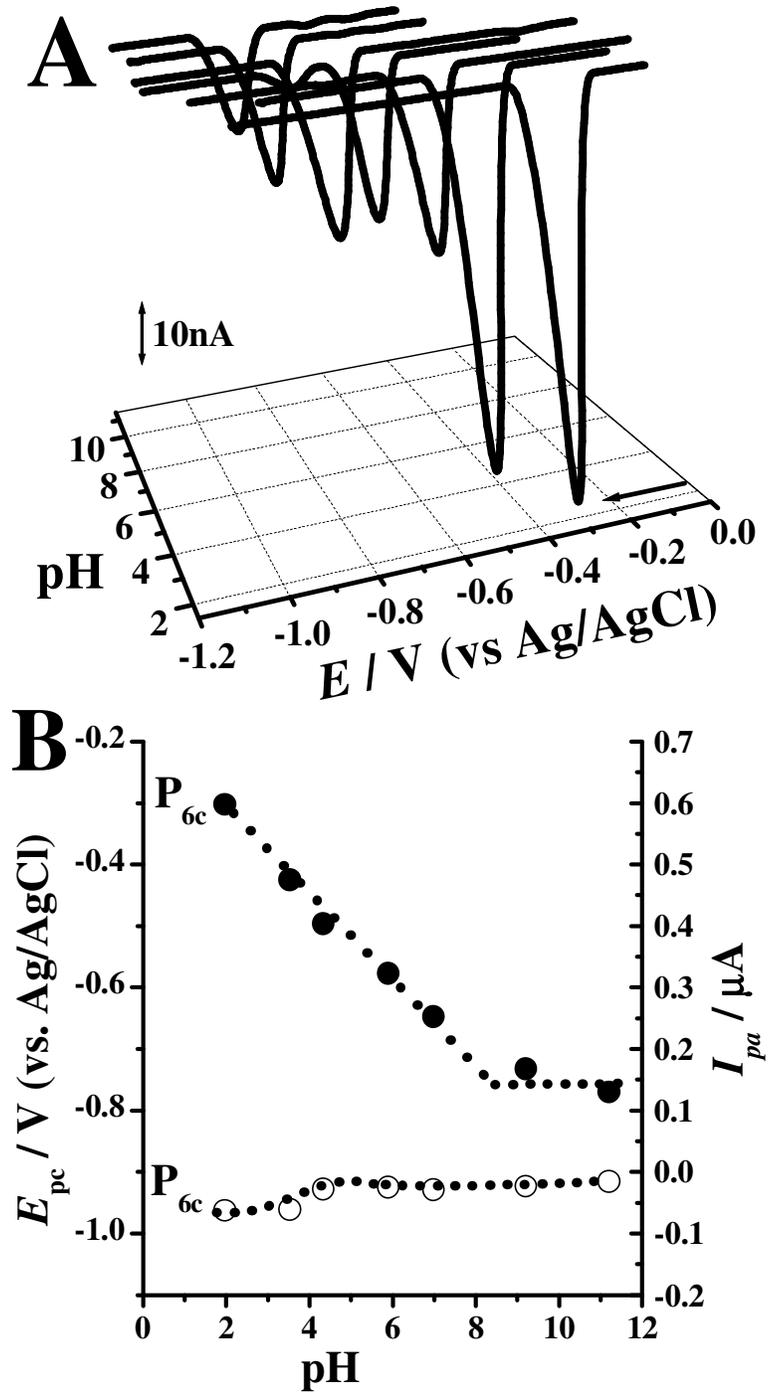


Figura 6.14 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção da linha de base, numa solução de 10 μM de isatina-3-hidrazona, em função do pH. (B) Representação gráfica de (●) E_{p6c} e (○) I_{p6c} , do pico 6c em função do pH.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

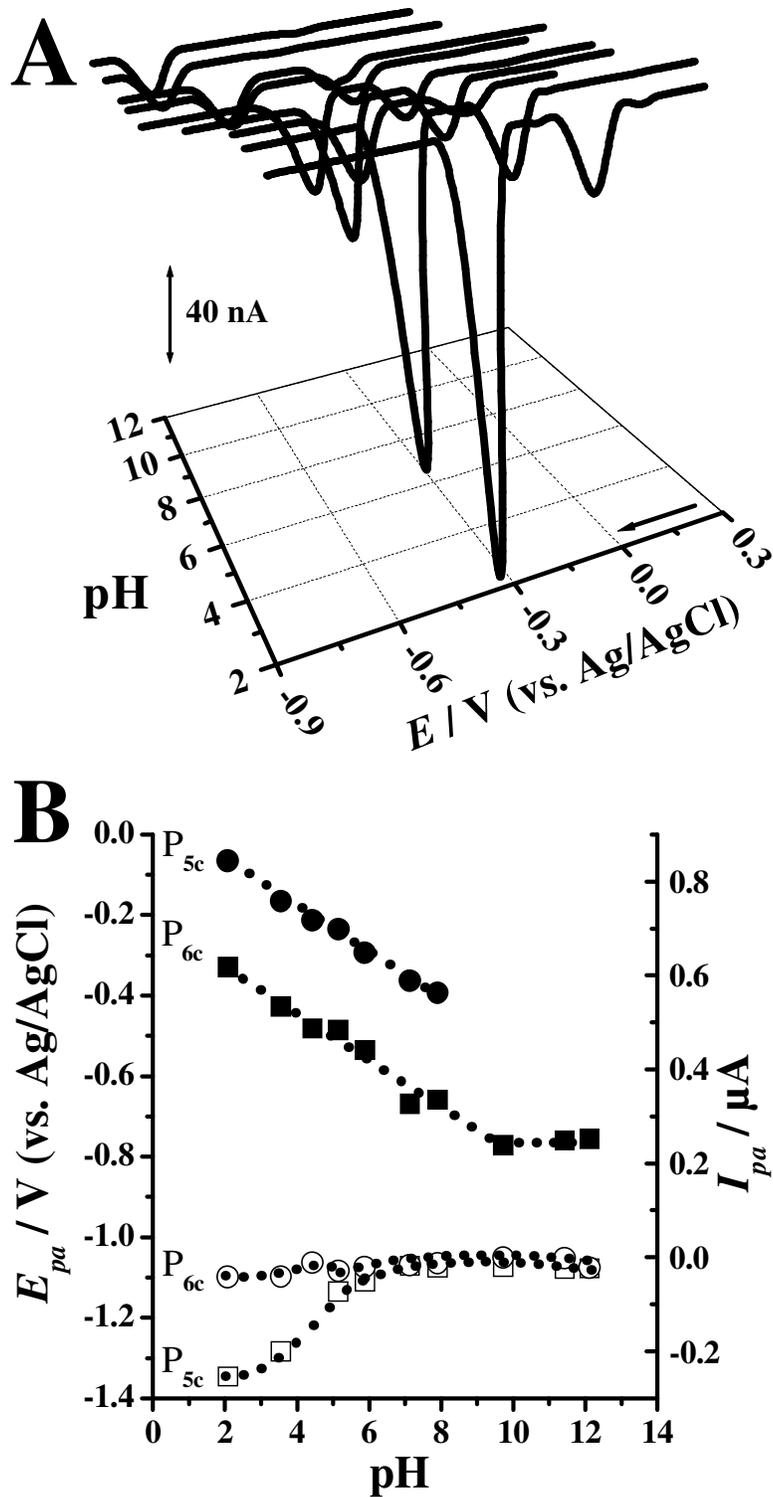


Figura 6.14 (A) Voltamogramas de impulso diferencial em 3D, com correção da linha de base, numa solução de 20 μM de 5-nitrosatonia, em função do pH. (B) Representação gráfica de (\bullet) E_{p5c} e (\circ) I_{p5c} do pico 5c e de (\blacksquare) E_{p6c} e (\square) I_{p6c} do pico 6c, em função do pH.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

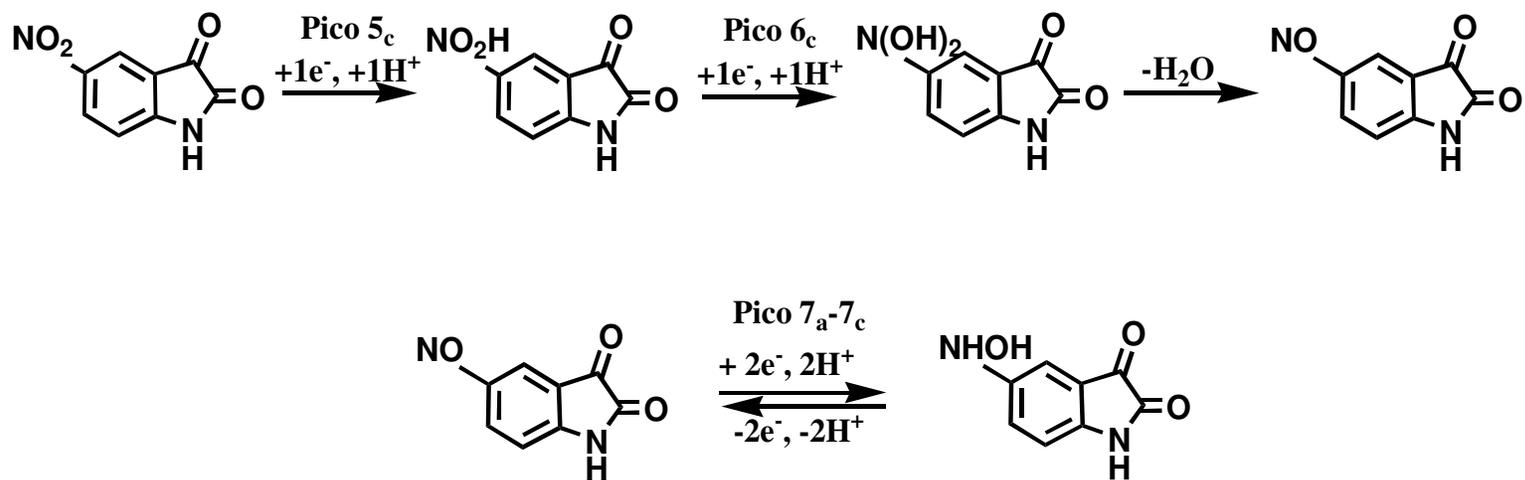


Figura 6.15 Mecanismo proposto para a redução da 5-nitroisatina.

6. Estudo do Comportamento Redox de um Grupo Azo-Derivados da ISA

Foram realizados voltamogramas de impulso diferencial numa solução de 5-nitroisatina e no intervalo de potencial de 0,0 V até - 0,4 V, sem limpar a superfície do GCE entre cada varrimento. No segundo varrimento não se detetou nenhum produto de redução eletroativo. A mesma experiência foi repetida mas desta vez no intervalo de potencial de 0,0 V até -1.2 V e no primeiro varrimento observaram-se os dois picos de redução, pico 5c, a $E_{p5c} = - 0,40$ V e o pico 6c, a $E_{p6c} = - 0,77$ V. No segundo varrimento observou-se um novo pico de redução, o pico 7c, a $E_{p7c} = - 0,11$ V, que está associado aos produtos formados no pico 6c. Esta experiência confirma que a redução está associada ao grupo nitro uma vez que os produtos de redução da isatina não são eletroativos. O mecanismo proposto para a redução da 5-nitroisatina está representado na **Fig. 6.15**.

Neste processo ocorrem duas etapas, a primeira em que ocorre a formação dos picos de redução 5c e 6c, e que dá origem à 5-nitrosoisatina e a segunda em que se dá a oxidação da 5-hidroxiaminaisatina a 5-nitrosoisatina, um processo reversível e que envolve a transferência de dois elétrões e dois prótões, pico 7a - 7c, **Fig. 6.4A**. Pode concluir-se que quando se aplicam potenciais com valores muito negativos, favorece-se a redução da 5-nitrosoisatina a 5-hidroxiaminaisatina.

Capítulo 7

Conclusões

Ao longo deste trabalho realizou-se pela primeira vez, a investigação do comportamento eletroquímico e dos mecanismos de oxidação e de redução de vários compostos, nomeadamente a temozolomida (TMZ), o clioquinol (CQ), os antioxidantes daidzeína (DZ) e 7-hidroxi-4-cromona (7-OH-4-CHM) e um conjunto de seis compostos azotados, todos eles derivados da isatina, incluindo a própria isatina. Para este efeito, foram realizadas experiências voltamétricas com um GCE, usando as técnicas de voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada. O estudo sistemático dos processos de eléctrodo, envolvidos na oxidação e na redução eletroquímica dos vários compostos, foi investigado em diferentes eletrólitos de suporte em que o pH variou entre 2 e 12.

A TMZ é um medicamento antineoplásico que pertence à categoria dos agentes quimioterapêuticos, e que é utilizado no tratamento de tumores malignos, entre os quais, os tumores cerebrais. Os resultados obtidos no estudo eletroquímico permitiram propor os mecanismos da oxidação e da redução da TMZ.

A redução eletroquímica da TMZ é um processo irreversível, controlado por difusão e dependente do pH. O processo ocorre num único passo, com a formação do pico catódico 2c, o qual está associado com a adição de um eletrão e de um protão ao carbono C5 para formar um radical anião, provocando a abertura irreversível do anel tetrazino. O coeficiente de difusão calculado para a TMZ, em pH = 7,1 tampão fosfato 0,1 M, foi $D_{\text{TMZ}} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

A oxidação eletroquímica da TMZ também é um processo irreversível e dependente do pH até ao valor próximo da constante de ionização. Para eletrólitos com pH < 5,2 o processo ocorre num único passo com a formação do pico anódico 1a, enquanto que para eletrólitos com pH ≥ 5,2 a oxidação passa a ocorrer em dois passos, com a formação dos picos de oxidação 1a e 3a. A constante de ionização determinada

para a TMZ foi de $pK_a \sim 9$. Na primeira etapa de oxidação, um eletrão e um protão foram removidos do anel tetrazino, seguido do ataque nucleofílico por parte da água, para formar um produto hidroxilado, provocando posteriormente a ruptura irreversível do anel tetrazino da TMZ. Na segunda etapa de oxidação, em que ocorre a formação do pico 3a, foram removidos um eletrão e um protão ao nitrogénio do anel já aberto na primeira etapa. Foi também desenvolvido um método para a determinação eletroanalítica da TMZ, em que o limite de deteção foi $LOD = 1,1 \mu M$ e o de quantificação foi $LOQ = 3,7 \mu M$.

O CQ é um agente antimicrobiano, capaz de eliminar ou inibir a multiplicação de microorganismo, utilizado no tratamento de infeções da pele como eczema, pé de atleta e outras infeções fúngicas. Recentemente, tem sido estudado como uma possível terapêutica no tratamento de doenças não infecciosas, como as doenças cancerosas e as doenças degenerativas entre as quais Alzheimer, Parkinson e Huntington.

O mecanismo de oxidação do CQ foi proposto. A oxidação eletroquímica do CQ é um processo irreversível controlado por adsorção e dá origem a um produto de oxidação que adsorve fortemente na superfície do GCE. Os resultados obtidos indicam que a oxidação do CQ e do seu produto de oxidação são processos dependentes do pH. O mecanismo de oxidação está associado ao grupo fenólico na molécula e envolve a transferência de um eletrão e de um protão para produzir um radical, que é posteriormente oxidado dando origem a uma estrutura do tipo quinona com comportamento redox reversível. Com o objetivo de verificar a capacidade quelante do CQ, também foram realizadas experiências por voltametria de DP, na presença de iões de Zn^{2+} e Cu^{2+} , e observou-se a formação dos complexos metálicos com o CQ.

A DZ é uma isoflavona que possui uma grande variedade de funções farmacológicas e fisiológicas, destacando-se a sua elevada capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Para clarificar as propriedades físico-químicas da DZ e o seu mecanismo de oxidação, também se estudou a 7-OH-4-CHM, um composto de estrutura semelhante à DZ.

A oxidação eletroquímica da DZ é um processo irreversível, dependente do pH e controlado por difusão. A reação do processo de oxidação ocorre em dois passos com a formação dos dois picos anódicos que correspondem à oxidação dos dois grupos fenólicos da molécula, o grupo 4'-OH do anel B e o grupo 7-OH do anel A. Com base nos resultados de voltametria de DP e CV foi proposto o mecanismo de oxidação da

DZ. O mecanismo de oxidação do pico 1a da DZ corresponde à oxidação do grupo 4'-OH, em que ocorre a transferência de um eletrão e de um próton. O pico 2a corresponde à oxidação do grupo 7-OH, e este processo também envolve a transferência de um eletrão e de um próton. O coeficiente de difusão calculado para a DZ, em pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M, foi $D_{DZ} = 8,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, e o limite de deteção foi $LOD = 0,08 \text{ } \mu\text{M}$.

A oxidação eletroquímica da 7-OH-4-CHM também é um processo irreversível, dependente do pH e ocorre numa etapa simples que corresponde à oxidação do único grupo fenólico da molécula, o grupo 7-OH e o mecanismo de oxidação envolve a transferência de um eletrão e de um próton. Pela determinação eletroanalítica da 7-OH-4-CHM obteve-se o limite de deteção $LOD = 0,13 \text{ } \mu\text{M}$.

A oxidação da DZ e da 7-OH-4-CHM envolveu os grupos fenólicos. O primeiro passo da oxidação envolve a formação de um radical fenóxido que, por sua vez pode iniciar a polimerização levando à formação de produtos que são adsorvidos na superfície do eléctrodo. Nos dois mecanismos, a reação predominante é a polimerização entre radicais fenóxido por ligações éster ou/e acopamento oxidativo C-C, uma vez que não se observaram picos catódicos reversíveis característicos das quinonas nos CVs das duas moléculas. A constante de ionização determinada para ambos os compostos é $pK_{a1} = 7,5$. O grupo 4'-OH é mais facilmente oxidado do que o grupo 7-OH. Portanto a DZ é mais facilmente oxidada, conseqüentemente o seu poder redutor é melhor do que a 7-OH-4-CHM, estando de acordo com o facto de que a DZ tem um melhor poder antioxidante.

Finalmente, realizou-se o estudo eletroquímico de um conjunto de compostos azotados, derivados da isatina que possuem um perfil farmacológico muito vasto, onde se incluem diversas aplicações clínicas. Os resultados obtidos revelaram que os grupos funcionais, hidrazona, a semicarbazona, e o grupo nitro, ligados à estrutura anelar da isatina, apresentam diferentes mecanismos de oxidação e redução característicos de cada um dos grupos funcionais e propriedades redox distintas quando comparados com o comportamento eletroquímico da isatina.

Os mecanismos de oxidação dos derivados com os grupos funcionais hidrazona e semicarbazona ocorrem em processos irreversíveis, dependentes do pH, controlados por adsorção, e em duas etapas consecutivas com a formação de produtos de oxidação eletroativos. A constante de ionização determinada para a isatina-3-hidrazona é de

$pK_a \sim 9$. Os mecanismos de redução são idênticos à redução da isatina. O processo ocorre num único passo irreversível que envolve a formação de um pico catódico dependente do pH. Os grupos hidrazona e semicarbazona favorecem o carácter dador de eletrões enquanto o grupo nitro favorece o carácter de aceitador de eletrões da isatina.

O mecanismo de oxidação da 5-nitroisatina também é idêntico ao da isatina mas o mecanismo de redução é um processo que envolve dois passos com a formação de dois picos catódicos irreversível e um produto de redução eletroativo reversível. A constante de ionização determinada para a 5-nitroisatina é de $pK_a \sim 10$.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que as técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas com sucesso para a determinação de mecanismos de reações redox. Os mecanismos sugeridos para moléculas de interesse biológico e medicamentos investigados, permitam disponibilizar informações relevantes que possibilitam compreender as vias pelos quais estes compostos exercem a sua ação bioquímica assim como o seu metabolismo em sistemas biológicos. Em conjunto com outras técnicas possibilitam o desenvolvimento de novas moléculas com potencial uso farmacológico, elevada eficácia e maior seletividade.

Na eletroquímica, a eletroanálise também é importante uma vez que pode ser aplicada no controle da qualidade físico-química dos medicamentos. Os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens relativamente aos métodos vulgarmente usados principalmente no que respeita à elevada sensibilidade das técnicas voltamétricas, ao custo reduzido da análise, o facto de não usar solventes orgânicos, a rapidez com que a análise é efetuada e a possibilidade de miniaturizar e transportar o equipamento.

Capítulo 8

Bibliografía

1. Oliveira, S. C. B. and Oliveira-Brett, A. M., *In situ evaluation of chromium-DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. 398(4): p. 1633-1641.
2. Oliveira, S. C. B., Vivan, M. et al., *Electrochemical behavior of thalidomide at a glassy carbon electrode*. Electroanalysis, 2008. 20(22): p. 2429-2434.
3. Shirinzadeh, H. et al., *Electrochemical behavior of indole-3-carboxaldehyde izonicotinoyl hydrazones: discussion on possible biological behavior*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2010. 13(7): p. 619-627.
4. Pontinha, A. D. R., S. C. B. Oliveira, et al., *Electrochemical oxidation of metolazone at a glassy carbon electrode*. Electroanalysis, 2008.20(23): p. 2531-2536.
5. Cavalheiro, É. T. G., C. M. A. Brett, et al., *Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds*. Bioanalytical Reviews, 2012. 4(1): p. 31-53.
6. Ghalkhani, M., Fernandes, I. P. G. et al., *Electrochemical Redox Behaviour of Temozolomide Using a Glassy Carbon Electrode*. Electroanalysis, 2010. 22 (22): p. 2633-2640.
7. Fernandes, I.P.G. et al., *Electrochemical Oxidation Mechanisms of the Antioxidants Daidzein and 7-Hydroxy-4-chromone*. Electroanalysis, 2012. 24(3): p. 618-626.
8. Ghalkhani, M. et al., *Anodic behavior of clioquinol at a glassy carbon electrode*. Bioelectrochemistry. 2011. 80(2): p. 175-181.
9. Oliveira, S. C. B., Fernandes, I.P.G. et al., *Isatin nitro-derivatives redox behaviour*, artigo submetido.
10. Brunton, L.L., Lazo, J.S. e Parker, K.L., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica - Goodman & Gilman*. 11^a ed. 2010: McGraw-Hill
11. Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A. et al., *Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?* Molecular Pharmacology, 2001. 59 (4): p. 657-663.
12. Nifontov, V. I., Bel'skaya, N. P. et al., *The reactivity and mechanism of action of triazenes (review)*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 1994. 28 (10): p. 687-706.
13. Hörner, M., et al., *Triazenes and antibacterial activity*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2008. 44(3): p. 441-449.
14. Caporaso, P., Turriziani, M. et al., *Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia*. DNA repair, 2007. 6(8): p. 1179-1186.

15. Marchesi, F. et al., *Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems*. Pharmacological Research, 2007. 56 (4): p. 275-287.
16. Stupp, R. et al., *Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours*. The lancet oncology, 2001. 2(9): p. 552-560.
17. Stevens, M. F. G. et al., *Antitumour imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl) imidazo [5, 1-d]-1, 2, 3, 5-tetrazin-4 (3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent*. Journal of Medicinal Chemistry, 1984. 27(2): p. 196-201.
18. Seiter, K. et al., *Phase I study of temozolomide in relapsed/refractory acute leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2002. 20(15): p. 3249-3253.
19. Infarmed, *Prontuário farmacêutico 10*. Março 2011, Portugal: INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério da Saúde
20. Tsang, L. L. H. et al., *Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl) imidazole-4-carboxamide*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1991. 27(5): p. 342-346.
21. Agarwala, S. S. and Kirkwood, J. M., *Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma*. The Oncologist, 2000. 5(2): p. 144-151.
22. Shen, F., Decosterd, L. A. et al., *Determination of temozolomide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1995. 667(2): p. 291-300.
23. Kim, H., Likhari, P. et al., *High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001. 24(3): p. 461-468.
24. Kim, H. K. et al., *High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997. 703(1-2): p. 225-233.
25. Saravanan, G., Ravikumar, M. et al., *A stability-indicating LC assay and degradation behavior of temozolomide drug substances*. Chromatographia, 2007. 66(3): p. 291-294.
26. Artemov, D., Bhujwalla, Z. M. et al., *Pharmacokinetics of the ¹³C labeled anticancer agent temozolomide detected in vivo by selective cross-polarization transfer*. Magnetic resonance in medicine, 1995. 34(3): p. 338-342.

27. Kato, Y. et al., *Noninvasive detection of temozolomide in brain tumor xenografts by magnetic resonance spectroscopy*. *Neuro-Oncology*, 2009. 12(1): p. 71-79.
28. Rice-Evans, C., Miller, N. et al., *Antioxidant properties of phenolic compounds*. *Trends in plant science*, 1997. 2(4): p. 152-159.
29. Vermerris, W. and Nicholson, R., *Phenolic compound biochemistry*. 2006, Springer Verlag.
30. Angelo, P. M. and Jorge, N., *Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2007. 66(1): p. 1-9.
31. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review*. *International journal of food microbiology*, 2004. 94(3): p. 223-253.
32. De Martino, L., De Feo, V. et al., *Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components*. *Natural product communications*, 2009. 4(12): p. 1741-1750.
33. Degáspari, C. H. and Waszczynskyj, N., *Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos*. *Visão Académica*, 2004. 5(1): p. 33-40.
34. Estevinho, L., Pereira, A. P. et al., *Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey*. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. 46(12): p. 3774-3779.
35. Ryu, S. Y., Choi, S. U. et al., *Antitumor activity of some phenolic components in plants*. *Archives of Pharmacal Research*, 1994. 17(1): p. 42-44.
36. Sengul, M., Yildiz, H. et al., *Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants*. *Pak. J. Pharm. Sci*, 2009. 22(1): p. 102-106.
37. Vaquero, M. J., Alberto, M. R. et al., *Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines*. *Food Control*, 2007. 18(2): p. 93-101.
38. Rappoport, Z. and Ebrary, I., *The chemistry of phenols*. 2003: Wiley New York.
39. Carey, F.A. and Sundberg, R.J., *Advanced organic chemistry: Structure and mechanisms*. 2007, NY: Springer Verlag.
40. Morrison, R. and Boyd, R., *Química Orgânica*, 2^a ed. 1970, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
41. Carey, F.A. and Sundberg, R.J., *Advanced organic chemistry: Structure and mechanisms*. 2007, NY: Springer Verlag.

42. Morrison, R. and Boyd, R., *Química Orgânica*, 2^a ed. 1970, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
43. Gattrell, M. and Kirk, D. W., *The electrochemical oxidation of aqueous phenol at a glassy carbon electrode*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 1990. 68 (6): p. 997-1003.
44. Boudenne, J. L., Cerclier, O. et al., *Electrochemical oxidation of aqueous phenol at a carbon black slurry electrode*. Applied Catalysis A: General, 1996. 143 (2): p. 185-202.
45. Janeiro, P. and Brett, A.M.O., *Catechin electrochemical oxidation mechanisms*. Analytica chimica acta, 2004. 518 (1): p. 109-115.
46. Janeiro, P., I. Novak, et al., *Electroanalytical Oxidation of p-Coumaric Acid*. Analytical letters, 2007. 40 (17): p. 3309-3321.
47. Janeiro, P and Brett, A.M.O. *Redox Behavior of Anthocyanins Present in Vitis vinifera L*. Electroanalysis, 2007. 19 (17): p. 1779-1786.
48. Sekher Pannala, A., Chan, T. S. et al., *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 282(5): p. 1161-1168.
49. Cao, G., Sofic, E. et al., *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-Activity Relationships*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. 22(5): p. 749-760.
50. Ernst, G., *Antioxidant potential of ferulic acid*. Free Radical Biology and Medicine, 1992. 13(4): p. 435-448.
51. Limón-Pacheco, J. and Gonsebatt, M. E., *The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009. 674 (1-2): p. 137-147.
52. Pietta, P. G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products, 2000. 63(7): p. 1035-1042.
53. Dwiecki, K., Neunert, G. et al., *Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. 96(3): p. 242-248.

54. Mueller, S. O., Simon, S. et al., *Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells*. Toxicological Sciences, 2004. 80(1): p. 14-25.
55. Hwang, C. S., Kwak, H. S. et al., *Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006. 101: p. 246-253.
56. Markiewicz, L., Garey, J. et al., *In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1993. 45(5): p. 399-405.
57. Marotta, F., Mao, G. S. et al., *Anti-inflammatory and Neuroprotective Effect of a Phytoestrogen Compound on Rat Microglia*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. 1089(1): p. 276-281.
58. Siow, R. C. M., Li, F. Y. L. et al., *Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: Transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. 42(7): p. 909-925.
59. Kris-Etherton, P. M. et al., *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. The American Journal of Medicine, 2002. 113(9, Supplement 2): p. 71-88.
60. Rabiau, N. g., Kossaï, M. et al., *Genistein and daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by Polymerase Chain Reaction arrays in human prostate cancer cell lines*. Cancer Epidemiology, 2010. 34(2): p. 200-206.
61. Guo, J. M., Xiao, B. X. et al., *Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells*. Food and Chemical Toxicology 2004. 42(10): p. 1641-1646.
62. Chen, J., Lin, H. et al., *Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2005. 55(2): p. 159-169.
63. Miltyk, W., Craciunescu, C. N. et al., *Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer*. The American journal of clinical nutrition, 2003. 77(4): p. 875-882.
64. Wang, H. Z., Zhang, Y. et al., *Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. 13(7): p. 421-426.
65. Messina, M. J., Persky, V. et al., *Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data*. Nutrition and cancer, 1994. 21(2): p. 113-131.

66. Liang, J., Tian, Y. X. et al., *Daidzein as an antioxidant of lipid: Effects of the microenvironment in relation to chemical structure*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. 56(21): p. 10376-10383.
67. Schmidt, S., Michna, H. et al., *Combinatory effects of phytoestrogens and 17 β -estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2005. 94(5): p. 445-449.
68. Esteves, E. A. and Monteiro, J. B. R., *Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças coronárias*. Rev. Nutr, 2001. 14(1): p. 43-52.
69. Aguiar, C. L., Alencar, S. M. et al., *Transformações enzimáticas de flavonóides*. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 2007. 25(1): p. 61-76.
70. Dixon, R. A., *Phytoestrogens*. Annual Review of Plant Biology, 2004. 55: p. 225-261.
71. Wang, C.-C., Prasain, J. K. et al., *Review of the methods used in the determination of phytoestrogens*. Journal of Chromatography B, 2002. 777(1-2): p. 3-28.
72. Klejdus, B. I., Vacek, J. et al., *Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography B, 2004. 806(2): p. 101-111.
73. da Costa César, I. et al., *Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2007. 17(4): p. 616-625.
74. Nurmi, T., Mazur, W. et al., *Isoflavone content of the soy based supplements*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002. 28(1): p. 1-11.
75. Müllner, C. and Sontag, G., *HPLC with coulometric electrode array detection Determination of daidzein and genistein in soy based infant food, soy milk and soy based supplements*. European Food Research and Technology, 2000. 211(4): p. 301-304.
76. Ghosh, P. and Fenner, G. P., *Improved method for gas chromatographic analysis of genistein and daidzein from soybean (Glycine max) seeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(9): p. 3455-3456.
77. Moors, S., Blaszkewicz, M. et al., *Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS*. Molecular nutrition & food research, 2007. 51(7): p. 787-798.

78. Li, X., Shen, Q. et al., *Determination of daidzein in rat plasma by LC. Chromatographia*, 2008. 68(3): p. 201-205.
79. Clarke, D. B., Bailey, V. et al. *Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS. Food Additives and Contaminants*, 2008. 25(5): p. 534-547.
80. Mikelová, R. et al., *Determination of isoflavones using liquid chromatography with electrochemical detection. Acta Chimica Slovenica*, 2007. 54(1): p. 92-97.
81. Wang, C. Y., Huang, H. Y. et al., *Analysis of Puerariae radix and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A*, 1998. 802(1): p. 225-231.
82. Escarpa, A., González, M. C. et al., *Evaluation of Accuracy of Electrochemical Isoflavonoid Index for the Determination of Total Isoflavones in Soy Samples. Electroanalysis*, 2007. 19(9): p. 952-957.
83. Chen, G., Zhang, J. et al., *Determination of puerarin, daidzein and rutin in Pueraria lobata (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Journal of Chromatography A*, 2001. 923(1-2): p. 255-262.
84. Han, R. M., Tian, Y. X. et al., *Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. 57(9): p. 3780-3785.
85. Brett, A. M. O. and Ghica M. E. *Electrochemical oxidation of quercetin. Electroanalysis*, 2003. 15(22): p. 1745-1750.
86. Liu, A., Zhang, S. et al., *Electrochemical oxidation of luteolin at a glassy carbon electrode and its application in pharmaceutical analysis. Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2008. 56(6): p. 745-748.
87. Janeiro, P. and Brett, A. M. O., *Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media. Electroanalysis*, 2005. 17(9): p. 733-738.
88. Ghica, M. E. and Brett, A. M. O., *Electrochemical oxidation of rutin. Electroanalysis*, 2005. 17(4): p. 313-318.
89. Yassin, M. S., Ekblom, J. et al., *Changes in uptake of vitamin B12 and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. Journal of the Neurological Sciences*, 2000. 173(1): p. 40-44.
90. Mao, X. and Schimmer, A. D., *The toxicology of clioquinol. Toxicology Letters*, 2008. 182: p. 1-6.
91. Meade, T. W., *Subacute myelo-optic neuropathy and clioquinol. An epidemiological case-history for diagnosis. British Journal of Preventive & Social Medicine*, 1975. 29(3): p. 157-169.

92. Weiner, M. W. et al., *The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: progress report and future plans*. *Alzheimer's and Dementia*, 2010. 6(3): p. 202-211.
93. Rauk, A., *The chemistry of Alzheimer's disease*. *Chemical Society Reviews*, 2009. 38(9): p. 2698-2715.
94. Smith, D. G., Cappai, R. et al., *The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β -peptide*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2007. 1768(8): p. 1976-1990.
95. Zheng, H. et al., *Site-activated chelators targeting acetylcholinesterase and monoamine oxidase for Alzheimer's therapy*. *ACS Chemical Biology*, 2010. 5(6): p. 603-610.
96. Cherny, R. A., Atwood, C. S. et al., *Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease Transgenic Mice*. *Neuron*, 2001. 30(3): p. 665-676.
97. Benvenisti-Zarom, L., Chen, J. et al., *The oxidative neurotoxicity of clioquinol*. *Neuropharmacology*, 2005. 49(5): p. 687-694.
98. Pithadia, A. S. and Lim, M. H., *Metal-associated amyloid- β species in Alzheimer's disease*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2012. 16(1-2): p. 67-73.
99. Ritchie, C. W. et al., *Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial*. *Archives of Neurology*, 2003. 60(12): p. 1685-1691.
100. Kurz, A. and Pernecky, R., *Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2011. 35(2): p. 373-379.
101. Nguyen, T., Hamby, A. et al., *Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(33): p. 11840-11845.
102. Kaur, D., Yantiri, F. et al., *Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: A novel therapy for Parkinson's disease*. *Neuron*, 2003. 37(6): p. 899-909.
103. Chen, D., Cui, Q. C. et al., *Clioquinol, a therapeutic agent for Alzheimer's disease, has proteasome-inhibitory, androgen receptor-suppressing, apoptosis-inducing, and antitumor activities in human prostate cancer cells and xenografts*. *Cancer research*, 2007. 67(4): p. 1636.

104. Daniel, K. G., Chen, D. et al., *Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2005. 7(6): p. 897-908.
105. Weber, E., *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 1995, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
106. Rani, P., Srivastava, V.K. and Kumar, A., *Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2004. 39(5): p. 449-452.
107. Palluoto, F., Campagna, F. et al., *Synthesis and antibacterial activity of pyridazino [4,3-b]indole-4-carboxylic acids carrying different substituents at N-2*. II Farmaco, 2002. 57: p. 63-69.
108. Tan, D. X., Reiter, R. J. et al., *Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger*. Current topics in medicinal chemistry, 2002. 2(2): p. 181.
109. Andreani, A., Burnelli, S. et al., *Antitumor Activity of Bis-indole Derivatives (I)*. Journal of medicinal chemistry, 2008. 51(15): p. 4563-4570.
110. Radwan, M. A. A., Ragab, E. A. et al., *Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2007. 15(11): p. 3832-3841.
111. d'Ischia, M., Palumbo, A. et al., *Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage*. Tetrahedron, 1988. 44(20): p. 6441-6446.
112. Igosheva, N., Lorz, C. et al., *Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose-and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells*. Neurochemistry international, 2005. 47(3): p. 216-224.
113. Watkins, P., Clow, A. et al., *Isatin, regional distribution in rat brain and tissues*. Neurochemistry international, 1990. 17(2): p. 321-323.
114. Medvedev, A., M. Crumeyrolle-Arias, et al., *Natriuretic peptide interaction with [³H] isatin binding sites in rat brain*. Brain research, 2005. 1042(2): p. 119-124.
115. Silva, J. F. M., Garden, S. J. et al., *The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2001. 12(3): p. 273-324.
116. Farghaly, M., Abdel-Wahab, B. F. et al., *Synthesis, antiviral and antimicrobial screening of some new 2-oxoindoline derivatives*. Chemistry of heterocyclic compounds, 2009. 45(5): p. 539-544.

117. Cerchiaro, G. and Ferreira, A. M. C., *Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potential pharmacological agents*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2006. 17(8): p. 1473-1485.
118. Glover, V., Reveley, M. A. et al., *A monoamine oxidase inhibitor in human urine*. Biochemical pharmacology, 1980. 29(3): 467.
119. Glover, V., Bhattacharya, S. K. et al., *The psychopharmacology of isatin: a brief review*. Stress and Health, 1998. 14(4): p. 225-229.
120. Medvedev, A. E., Clow, A. et al., *Isatin: A link between natriuretic peptides and monoamines?* Biochemical pharmacology, 1996. 52(3): p. 385-391.
121. Medvedev, A., Bussygyna, O. et al., *Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets*. Biochemical pharmacology, 2002. 63(4): p. 763-766.
122. da Silva, B. N. M., Bastos, R. S. et al., *Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir isonitroacetanilida*. Quim. Nova, 2010. 33(10): p. 2279-2282.
123. Shvekhgeimer, M. G. A., *Synthesis of heterocyclic compounds by the cyclization of isatin and its derivatives (review)*. Chemistry of heterocyclic compounds, 1996. 32(3): p. 249-276.
124. Shuttleworth, S. J., Nasturica, D. et al., *Parallel synthesis of isatin-based serine protease inhibitors*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2000. 10(22): p. 2501-2504.
125. Rollas, S. and küçükgüzel, S. G., *Biological activities of hydrazone derivatives*. Molecules, 2007. 12(8): p. 1910-1939.
126. Sridhar, S. K., Pandeya, S. N. et al., *Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives*. European journal of pharmaceutical sciences, 2002. 16(3): p. 129-132.
127. Adibi, H., Khodaei, M. M. et al., *Synthesis, characterization, and in vitro antimicrobial evaluation of hydrazone and bishydrazone derivatives of isatin*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2010. 44(4): p. 219-227.
128. Rodríguez-Argüelles, M. C., Ferrari, M. B. et al., *Synthesis, characterization and biological activity of Ni, Cu and Zn complexes of isatin hydrazones*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004. 98 (2): p. 313-321.
129. Beraldo, H., *Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications*. Quimica Nova, 2004. 27(3): p. 461-471.

130. Pandeya, S. N., Smitha, S. et al., *Biological activities of isatin and its derivatives*. Acta Pharm., 2005. 55(1): p. 27-46.
131. Pelosi, G., Pelizzi, C. et al., *Isatin 3-semicarbazone and 1-methylisatin 3-semicarbazone*. Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, 2005. 61(10): p. 589-592.
132. Tomchin, A. B., Zhmykhova, I. L. et al., *Heterocyclic semicarbazones and thiosemicarbazones. XLIX. Antiinflammatory activity of isatin thiosemicarbazones and their cyclization products*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 1986. 20(9): p. 619-624.
133. Tenório, R.P., Góes, A.J.S. et al., *Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica*. Química Nova, 2005. 28 (6): p. 1030.
134. Silva, V. B., *Uma nova promessa para o tratamento do câncer, Novidades na Ciência – SBQ Rio, 29 de Julho de 2009*. Disponível em: <<http://www.uff.br/sbqrio/>>.
135. Pandeya, S. N. and Dimmock, J. R., *Recent evaluations of thiosemicarbazones and semicarbazones and related compounds for antineoplastic and anticonvulsant activities*. Die Pharmazie, 1993. 48(9): p. 659-666.
136. Karki, S. S., Thota, S. et al., *Synthesis, anticancer, and cytotoxic activities of some mononuclear Ru (II) compounds*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2007. 15(21): p. 6632-6641.
137. Finkielstein, L. M., Castro, E. F. et al., *New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV*. European journal of medicinal chemistry, 2008. 43(8): p. 1767-1773.
138. Karali, N., Gürsoy, A. et al., *Synthesis and structure-antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2, 3-dione derivatives*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2007. 15(17): p. 5888-5904.
139. Bal, T. R., Anand, B. et al., *Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin \hat{I}^2 -thiosemicarbazone derivatives*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2005. 15(20): p. 4451-4455.
140. Kandemirli, F., Arslan, T. et al., *Synthesis and theoretical study of 5-methoxyisatin-3-(N-cyclohexyl) thiosemicarbazone and its Ni (II) and Zn (II) complexes*. Journal of Molecular Structure, 2009. 938(1-3): p. 89-96.
141. Vine, K. L., Locke, J. M. et al., *In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007. 15 (2): p. 931-938.

142. Vine, K. L., Matesic, L. et al., *Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)*, 2009. 9(4): p. 397-414.
143. Gupta, A. K. and Sindal, R. S., *A comparative study of electrochemical reduction of isatin and its synthesized Schiff bases at HMDE*. *Journal of chemical sciences*, 2009. 121(3): p. 347-351.
144. Farnia, G., Capobianco, G. et al., *Polarographic behaviour of isatin and some of its derivatives in DMF*. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1973. 45(3): p. 397-404.
145. Diculescu, V. C., Kumbhat, S. et al., *Electrochemical behaviour of isatin at a glassy carbon electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. 575(2): p. 190-197.
146. Brett, C. M. A. and Oliveira-Brett, A. M., *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*, 1993. New York, US: Oxford University Press Inc.
147. Brett, C. M. A. and Oliveira-Brett, A. M., *Electroanalysis*. 1998. New York, US: Oxford University Press Inc.
148. Kissinger, P.T. and Heineman, W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. 2nd ed, 1996. New York: Marcel Dekker, Inc.
149. Lai, Y. et al., *Synthesis and biological evaluation of 3-[4-(amino/methylsulfonyl)phenyl]methylene-indolin-2-one derivatives as novel COX-1/2 and 5-LOX inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010. 20(24): p. 7349-7353.
150. Zhou, L. et al., *Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors*. *J. Med. Chem.*, 2006. 49(12): p. 3440-3443.
151. Calvery, H. O., Noller, C. R. and Adams, R., *Arsonophenyl-cinchoninic acid (arsonocinchophen) and derivatives. II*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1925. 47(12): p. 3058-3060.
152. Sandmeyer, T., *Über Isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen*. *Helv. Chim. Acta*, 1919. 2(1): p. 234-242.
153. Beynon, R. and Easterby, J., *The basics buffer Solutions*, 1996. Oxford: Oxford University Press.
154. <http://www.hbcpnetbase.com/>, *Handbook of Chemistry and Physics*.
155. S.C.B. Oliveira, V.C. Diculescu, et al., *Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and in situ evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical DNA biosensor*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. 588(2): p. 283-291.

156. King, F. D., *Medicinal chemistry: principles and practice*. 2nd ed. 2002, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, cap. 10.
157. Albert, A. and Briggs, J. M., *The Determination of Ionisable Constants*. 1971. London: Chapman and Hall.
158. Castro, G.T., et al., *Determination of the pK_a of hydroxyl-benzophenones in ethanol-water mixtures. Solvent effects*. Journal of molecular Structure (Theochem), 2003. 626: p. 167-178.
159. Manjanatha, M. et al., *Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue[®] transgenic rats*. Carcinogenesis, 2006. 27(12): p. 2555-2564.
160. Lund, H. and Hammerich, O., *Organic Electrochemistry*, 4th ed. 2001, New York: Marcel Dekker
161. Yang, Z.P., et al., *Electrochemical oxidation of 8-hydroxyquinoline and selective determination of tin (II) at solid electrodes*. Electroanalysis, 1996. 8: p. 25-29.
162. Mukae, F. et al., *Electrochemical behavior of the naphthoquinone anchored onto a gold electrode through the self-assembled monolayers of aminoalkanethiol*. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996. 69: p. 2461-2464.
163. Petrova, S.A. et al., *Redox Properties of Naturally Occurring Naphthoquinones: Vitamin K₂₍₂₀₎ and Lapachol*. Russian J. Electrochem., 2000. 36: p. 767-772.
164. Nematollahi, D. et al., *Electrochemical oxidation of some dihydroxybenzene derivatives in the presence of indole*. J. Electroanal. Chem., 2008. 616: p. 79-86.
165. Wang, J. et al., *Electrocatalytic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes*. Electrochim. Acta, 2001. 47: p. 651-657.
166. Salimi, A. L., et al., *Amperometric and voltammetric detection of hydrazine using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and catechol derivatives*. Talanta, 2008. 75: p. 147-156.
167. Tabaković, I., et al., *Electrochemistry reactivity of biologically active quinine/hydroquinone sesquiterpenoids on glassy carbon electrodes*. Bioelectroch. Bioener, 1987. 17: p. 567-577.

168. Zhao, D.M., et al., *Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at PASA/MWNTs composite film modified glassy carbon electrode*. Colloid Surface B, 2009. 74: p. 317-321.
169. Al-Ayed, A.S. et al., *Micellar effects on the alkaline hydrolysis of isatin and its derivatives*. Journal of colloid and interface science, 2011. 357(2): p. 393-399.
170. Pandeya, S.N. et al., *Synthesis of isatin semicarbazones as novel anticonvulsants-role of hydrogen bonding*. J. Pharm. Pharm. Sci, 2002. 5(3): p. 266-271.