

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CARLOS ALBERTO FERREIRA

COMPLEXOS DE DOPAMINA COM ALBUMINA
COMO MODELO PARA ETIQUETAGEM
ELETROQUÍMICA DE PROTEÍNAS DESPROVIDAS
DE CENTROS REDOX METÁLICOS

Alfenas/MG

2010

CARLOS ALBERTO FERREIRA

COMPLEXOS DE DOPAMINA COM ALBUMINA
COMO MODELO PARA ETIQUETAGEM
ELETROQUÍMICA DE PROTEÍNAS DESPROVIDAS
DE CENTROS REDOX METÁLICOS

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Alfenas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício
Schneedorf Ferreira da Siva.

Afenas/MG

2010

CARLOS ALBERTO FERREIRA

COMPLEXOS DE DOPAMINA COM ALBUMINA COMO MODELO
PARA ETIQUETAGEM ELETROQUÍMICA DE PROTEÍNAS
DESPROVIDAS DE CENTROS REDOX METÁLICOS.

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Alfenas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química.
Área de concentração: Físico-Química.
Orientador: Prof. Dr. José Maurício
Schneedorf Ferreira da Siva

Aprovada em: 05/03/2010

Prof^o. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:

Prof^o. Dr. Fabio Herbst Florenzano

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:

Prof^o. Dr. Efraim Lázaro Reis

Instituição: Universidade Federal de Viçosa-MG

Assinatura:

Dedico a Deus, a minha mãe,
meu pai(*in memoriam*),
aos meus filhos Gabriel e Gustavo
meus irmãos, amigos e toda família
pelo apoio na realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Schneedorf FS, pela confiança em mim depositada, por tudo que me ensinou. Obrigado por tudo!

À Edwiges pelo carinho, incentivo e apoio nessa minha jornada. Obrigado!

Ao pessoal do laboratório: Valdirene, Rose, Marta. Obrigado!

Aos colegas do curso: Adriano, Polyana, Giovanna, Ayla, Lucas, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis. Obrigado!

À Universidade Federal de Alfenas, pela grande oportunidade oferecida.

RESUMO

Uma estratégia muito simples para estudar as propriedades eletroquímicas para qualquer proteína foi desenvolvida por meio de ligações estáveis de dopamina, um neurotransmissor de mamíferos superiores, com albumina sérica bovina. Os resultados foram avaliados por voltametria cíclica, espectrofluorimetria e espectrofotometria de primeira derivada na região do visível. Eletrodos de pasta de carbono não modificados foram usados para identificar o complexo BSA-5-Cys-DA em solução, após isolamento por filtração molecular. Um aumento significativo do sinal de fluorescência de emissão em 350 nm em conjunto com o aparecimento de um sinal de absorção em 370 nm também foram identificados para o complexo. Neste sentido, a ligação covalente entre uma proteína teste com a dopamina revelou-se como um modelo favorável para estudos eletroquímicos de proteínas desprovidas de centros redox metálicos, juntamente com a sua capacidade dual para investigação eletroquímica e espectroscópica direta de proteínas, quer imobilizadas ou em solução.

Palavras-chave: Voltametria. Proteínas. Eletroquímica. Dopamina.

ABSTRACT

A very simple strategy for studying electrochemical properties for any protein was developed by cross-linking dopamine with BSA. The results were evaluated by cyclic voltammetry, spectrofluorimetry and first-derivative spectrophotometry in the visible range. Unmodified carbon paste electrodes were used for identify the BSA-5-Cys-DA complexes in solution. This approach allowed overlapping the sluggish kinetics of electron transfer exhibited by proteins with non-metallic redox centers near the surface electrode. Furthermore, a marked increased in fluorescence signal at 350 nm emission together with the appearance of a BSA absorption signal at 370 nm arouse from the protein adducts. In this sense the covalent linkage between a test protein with dopamine show it as a dual candidate able to display both electrochemical and spectroscopic signals, and allow the use of this approach for identify and analyze proteins either in solution or immobilized.

Key word: Voltammetry. Proteins. Electrochemistry. Dopamine.

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1 - Representação esquemática de um experimento de voltametria cíclica. Ei: potencial inicial; E_s: potencial de inversão; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; EA: eletrodo auxiliar.....</p> <p>Figura 2 - Estrutura da albumina humana, apresentando os três domínios do polipeptídeo. B - ampliação da estrutura em torno do resíduo de Cys-34 Fonte: STEWART et al., 2004.....</p> <p>Figura 3 - Estrutura da dopamina.....</p> <p>Figura 4 - Etapas da biossíntese da dopamina.....</p> <p>Figura 5 - Auto-oxidação da dopamina.....</p> <p>Figura 6 - Oxidação do catecol produzindo <i>o</i>-quinona.....</p> <p>Figura 7 - Intraciclização da dopamina-<i>o</i>-quinona.....</p> <p>Figura 8 - Representação do ataque nucleófilo (: Z) a dopamina-<i>orto</i>-quinona.....</p> <p>Figura 9 - Oxidação da DA, com formação de DA-<i>o</i>-quinona(1) e 5-S-cistenildopamina e 2-S-cistenildopamina.....</p> <p>Figura 10 - Curva analítica de DTNB com L-Cys, BSA e BSA complexada com N-etilmaleimida.....</p> <p>Figura 11 - Voltamograma cíclico da dopamina (8,3x10⁻⁵M), em solução tampão fosfato pH de 7,4 em eletrodo de pasta de carbono a velocidade de varredura de 100 mV/s.....</p> <p>Figura 12 - Voltamograma cíclico de dopamina (8,3.10⁻⁶M) obtido com eletrodo de pasta de carbono em velocidade de varredura entre 50 e 300 mV/s em tampão fosfato pH de 7,4 (R²=0,981).....</p> <p>Figura 13 - Correntes de pico anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. (R² = 0,981 para I_{pa} e R² = 0,946 para I_{pc}).....</p> <p>Figura 14 - Voltamograma cíclico da dopamina variando a concentração de 0,2 mM a 5,0mM com inserto I_{pa} x [dopamina] (R² = 0,99), no intervalo de potencial de -0,3 V a 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s em pH de 7,4.....</p> <p>Figura 15 - Cronoamperimétrica de eletro-oxidação da dopamina em diferentes potenciais aplicados.....</p> <p>Figura 16 - Voltamograma cíclico de dopamina antes e após a Eletro-oxidação (0,6 V durante 20 minutos) , num intervalo de potencial entre -0,3 e 0,6 V, com velocidade de varredura de 100 mV/s , em eletrodo de pasta de carbono.....</p>	<p>16</p> <p>27</p> <p>29</p> <p>31</p> <p>33</p> <p>33</p> <p>34</p> <p>34</p> <p>35</p> <p>44</p> <p>45</p> <p>46</p> <p>48</p> <p>49</p> <p>50</p> <p>51</p>
---	---

Figura 17 - Voltamograma cíclico de 10^{-3} mol.L ⁻¹ de dopamina complexada com 10^{-3} mol. L ⁻¹ de L-cisteína, (linha pontilhada) e 10^{-3} mol. L ⁻¹ de dopamina na presença de 10^{-3} mol. L ⁻¹ de ácido ascórbico e 10^{-3} mol. L ⁻¹ de L-cisteína (linha contínua), entre -0,3 V e 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s.....	52
Figura 18 - Resultados sobrepostos de absorbância das frações eluídas de BSA e dopamina sem pré-incubação, a partir dos ensaios.....	53
Figura 19 - Medidas da absorbância das frações coletadas da mistura BSA-dopamina após incubação.....	54
Figura 20 - Voltamograma cíclico de: b-dopamina; c- dopamina complexada com BSA após diálise e b- e BSA em tampão fosfato pH de 7,4 numa velocidade de varredura de 100 mV/s.....	55
Figura 21 - Etapas da eletro-oxidação de dopamina.....	56
Figura 22 - Gráfico de $\ln v \times E_{pa}$ de dopamina, como exemplo de representação para determinação de parâmetros cinéticos de transferência de carga ($R^2 = 0,964$).....	58
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos da dopamina e de BSA complexada com N-etilmaleimida (linha contínua) e do complexo BSA-dopaminocromo(linha pontilhada), após diálise em um potencial entre -0,3 e 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s em pH de 7,4 num eletrodo de pasta de carbono.....	59
Figura 24 - Oxidação da dopamina em dopamina-quinona e o resultado da conjugação com L-cisteína (5-cys –DA). Fonte: LAVOIE; HASTING, 1999.....	60
Figura 25 - Gráfico de i_{pa} do complexo BSA-dopaminocromo em função do tempo (dias).....	62
Figura 26 - Gráfico de E_{pa} do complexo BSA-dopaminocromo em função do pH.....	63
Figura 27 - Gráfico de i_{pa} do complexo BSA-dopaminocromo em função do pH.....	64
Figura 28 - Medidas de potencial de pico anódico para o complexo em função da velocidade de varredura entre 5 mV.s^{-1} e 500 mV.s^{-1}	65
Figura 29 - Espectrofluorimetria (A) e espectrofotometria de primeira derivada(B) do complexo de dopamina com BSA.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA –	Albumina de Soro Bovino.
DA –	Dopamina.
C –	Concentração.
CV –	Voltametria cíclica.
Cys –	Cisteína.
CPE –	Eletrodo de pasta de grafite.
DOQ-	Dopamina – <i>orto</i> -quinona
DTNB –	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
E –	Potencial.
E° –	Potencial padrão de eletrodo.
EPH -	Eletrodo Padrão de Hidrogênio
E_p –	Potencial de pico.
E_{pa} –	Potencial de pico anódico
E_{pc} –	Potencial de pico catódico.
$E_{1/2}$ –	Potencial de meia onda.
GC –	Eletrodo de carbono vítreo.
I_p –	Corrente de pico.
I_{pa} –	Corrente de pico anódico.
I_{pc} –	Corrente de pico catódico.
NEM –	N-etilmaleimida.
RE1-WE –	Eletrodo de referência 1- eletrodo de trabalho.
RE2-CE –	Eletrodo de referência 2- contra eletrodo.
TE –	Transferência de elétrons.
v –	Velocidade de varredura (Vs^{-1}).
ΔE_p –	Diferença de potencial de pico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Voltametria cíclica.....	14
1.2	Voltametria cíclica aplicada ao estudo de proteínas.....	19
1.3	Natureza dos centros redox protéicos.....	20
1.3.1	Metaloproteínas	21
1.3.2	Proteínas desprovidas de grupos prostéticos metálicos	21
1.4	Proteínas em solução e imobilizadas.....	22
1.4.1	Estudos eletroquímicos de proteínas em solução	22
1.4.1.1	<i>Membrana de Diálise</i>	22
1.4.1.2	<i>Interação com corantes</i>	23
1.4.2	Proteínas imobilizadas (promotores cross-linkers)	24
1.5	Albumina.....	26
1.5.1	Estrutura e função	26
1.5.2	Estudos eletroquímicos de albumina	27
1.6	Ligação covalente em proteínas.....	28
1.7	Dopamina.....	28
1.7.1	Estrutura, função e metabolismo	28
1.7.2	Complexação <i>in natura</i> de Dopamina e impactos clínicos	31
1.7.3	Eletro-Oxidação da Dopamina	33
1.7.3.1	<i>Noções Gerais</i>	33
1.7.3.2	<i>Formação de 5-S-Cys-Dopamaminocromo</i>	35

1.7.3.3	<i>Aplicações de Dopamina complexada para estudos eletroquímicos em proteínas.....</i>	35
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Geral.....	37
2.2	Específicos.....	37
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	39
4.1	Reagentes.....	39
4.2	Determinação de grupo tiol(-SH) livre.....	39
4.3	Formação do complexo entre DA e BSA.....	40
4.4	Calibração do Potenciostato/Galvanostato P-39 Omnimetra.....	40
4.5	Voltametria cíclica.....	41
4.5.1	Caracterização ciclovoltamétrica de Dopamina...	42
4.6	Espectrofotometria.....	42
4.7	Espectrofluorimetria.....	43
4.8	Análise de dados.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Determinações de Grupo Tiol(-SH) com DTNB.....	44
5.2	Ciclovoltametria da Dopamina.....	45
5.3	Ciclovoltamograma de BSA-Dopaminocromo.....	52
5.3.1	Resultados das frações coletadas após eluição cromatográfica de BSA e Dopamina.....	52
5.4	Estabilidade do complexo BSA-Dopaminocromo.....	61
5.5	Espectrofotometria.....	64
5.5.1	Espectrofotometria de primeira derivada do complexo BSA-S-Cys-DA.....	65
5.5.2	Espectrofluorimetria da BSA-5-Cys-dopamina.....	65
6	CONCLUSÕES.....	68

REFERÊNCIAS	69
ANEXO A	75
ANEXO B	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A eficiência dessa técnica resulta de sua habilidade de fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, sobre reações químicas acopladas e processos adsortivos (BRETT; BRETT, 1996).

Para estudos de voltametria cíclica utiliza-se normalmente, uma célula convencional composta por um sistema de três eletrodos (Figura 1): um de trabalho (ET), um de referência (ER), e um auxiliar (EA), imersos em solução mantida em condição estacionária. O eletrodo mais importante, onde ocorre a reação de interesse, é o de trabalho, que pode ser composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro, prata, platina, diamante, níquel, entre outros (BRETT ; BRETT, 1996).

O experimento inicia-se com aplicação do potencial com um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódicas), por exemplo, ocorre redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração desse composto. Posteriormente, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, em que os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução (Figura 1). O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (LOJOU et al., 2006).

Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo; o primeiro é a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo, e o segundo a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo. Em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas acopladas a alguns destes processos. A equação de Butler-Volmer, equação básica da cinética eletroquímica, expressa essas relações (WANG, 2001).

$$i = i_o \{ \exp(-\alpha_A n E \eta / RT) - \exp[(1-\alpha_C) n E \eta / RT] \} \quad (1)$$

onde, i_o corresponde a densidade de corrente de troca; η refere-se a sobrepotenciais do eletrodo ($E - E_o$); n é o número de elétrons envolvidos na transferência; α_A e α_C são os coeficiente de transferência de carga anódica e catódica respectivamente, T a temperatura em graus Kelvin e R a constante universal os gases ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficiente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação de Butler-Volmer se reduz a equação de Nernst (WANG, 2001).

$$E = E^\circ + (2,3RT/nF) \log(C_o/C_R) \quad (2)$$

sendo: E° o potencial padrão da reação redox, n o número de elétrons transferidos na reação, F a constante de Faraday ($9,6485 \cdot 10^4 \text{ C/mol}$), C_o a concentração da espécie oxidada, C_R a concentração da espécie reduzida (mols por centímetro cúbico), R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), e T a temperatura em graus Kelvin. Como a cinética da reação de transferência de carga é rápida, apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as normas do processo, a corrente do pico (em amperes) neste caso é dada pela equação de Randles-Sevcik, para sistemas reversíveis (WANG, 2001).

$$I_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (3)$$

onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D o coeficiente de difusão do analito ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C a concentração da espécie (mol cm^{-3}), e v a velocidade de varredura (V s^{-1}).

Na Figura 1 é representado esquematicamente um experimento de voltametria cíclica.

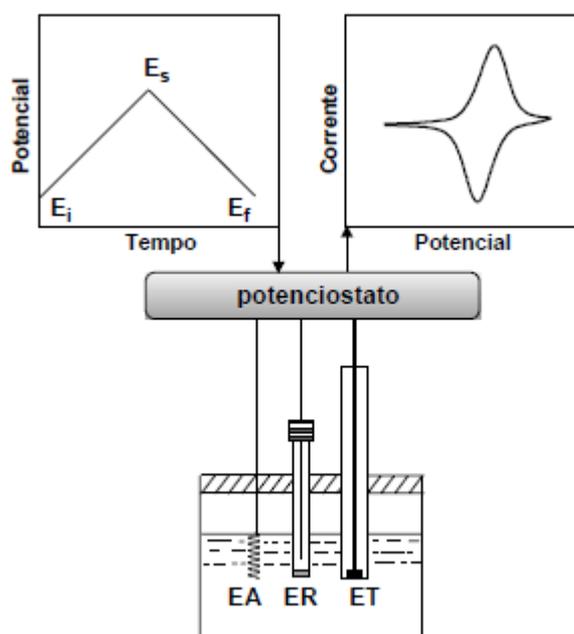


FIGURA 1 – Representação esquemática de um experimento de voltametria cíclica. E_i: potencial inicial; E_s: potencial de inversão; E_f: potencial de final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; EA: eletrodo auxiliar.

Várias outras informações importantes podem ser obtidas com o auxílio da voltametria cíclica, com destaque para estudos de espécies redoxes difundida livremente em solução, bem como de espécies imobilizadas sobre a superfície de eletrodos. Por outro lado, seu emprego em eletroanálise torna-se limitado quando se deseja quantificar baixas concentrações do analito (BRETT; BRETT, 1996).

a) Reações reversíveis

Para um sistema eletroquímico reversível, as espécies oxidadas e reduzidas são estáveis e a cinética do processo de transferência de elétrons é rápida. Assim, os voltamogramas cíclicos são caracterizados por apresentarem picos na varredura direta e reversa de potencial. A concentração de ambas as espécies envolvidas no processo eletroquímico pode ser calculada pela equação de Nernst (equação 2), pois o potencial e a velocidade do processo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo estão em equilíbrio.

Nesse tipo de reação, a velocidade de transferência de elétrons é sempre maior que o fluxo das espécies eletroativas do interior da solução para a superfície do eletrodo. A corrente do pico catódica do voltamograma é dada pela equação de Randles-Sevcik (Equação 3) (BRETT ; BRETT, 1996).

Existem vários critérios para diagnosticar se um sistema eletroquímico comporta-se reversivelmente, dentre eles:

I_p é proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura;

E_p é independente da velocidade de varredura;

$$|E_p - E_{p/2}| = 59/n \text{ (mV)};$$

$$|I_{pa}/I_{pc}| = 1 ;$$

$$E_{pa} - E_{pc} = 59/n \text{ (mV)}.$$

b) Reações irreversíveis

Em sistemas irreversíveis, não ocorre o equilíbrio nernstiano, ou seja, a velocidade de transferência de elétrons não mantém o equilíbrio das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Conseqüentemente, a forma do voltamograma cíclico é modificada, podendo ocorrer a ausência de pico na varredura reversa de potencial. Porém, essa característica não significa que o sistema seja eletroquimicamente irreversível, pois uma reação química

rápida acoplada ao processo de transferência eletrônica pode estar associada ao sistema eletroquímico, consumindo rapidamente a espécie formada na varredura direta.

Para sistemas irreversíveis, a corrente de pico catódica do voltamograma é dada pela equação 4:

$$I_{pc} = 2,99 \times 10^{-5} n(\alpha_c n)^{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

onde α_c é o coeficiente de transferência de carga catódico, que constitui uma medida da barreira de energia de ativação, aproximando-se de 0,5 para um condutor metálico e para um processo reversível de simples transferência de elétron (BRETT; BRETT, 1996).

Os critérios eletroquímicos para diagnosticar um sistema irreversível são:

Ausência de pico na varredura reversa de potencial;

I_p é proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura (v);

E_p desloca-se de $30/n\alpha$ (mV) para cada 10 vezes de aumento na velocidade de varredura;

$|E_p - E_{p/2}| = 48/n\alpha$ (mV).

c) Reações quase-reversíveis

Para um sistema quase-reversível (com $10^{-1} > k^0 > 10^{-5}$ cm/s) a corrente é controlada pela transferência de carga e transporte de massa. A forma do voltamograma cíclico é uma função de $k^0 \sqrt{\pi a D}$, onde $a = nFv/RT$. Quando $k^0 \sqrt{\pi a D}$ aumenta, o processo se aproxima de um caso reversível. Para pequenos valores de $k^0 \sqrt{\pi a D}$ (isto é, v é muito rápido), o sistema exibe um comportamento irreversível. Em geral, o voltamograma de um sistema quase-reversível é mais delineado e exibe uma grande separação entre os picos dos potenciais comparados com um sistema reversível (WANG, 2006).

1.2 Voltametria cíclica aplicada ao estudo de proteínas

A utilização de métodos voltamétricos para estudar proteínas com centro redox ativo tem despertado cada vez mais atenção. Após o início de estudos pioneiros nas décadas de 1970 e 1980, os métodos voltamétricos tornaram-se rotineiros na determinação de potenciais redox em sítios de pequenas proteínas. Já é bem conhecido que, com eletrodos adequados, pequenos transportadores de elétrons, tais como citocromos, ferredoxinas e proteínas contendo cobre, ferro, enxofre dentre outros elementos, dão respostas eletroquímicas reversíveis (ARMSTRONG; WILSON, 2000)

Os estudos de proteínas podem ser realizados através de métodos eletroquímicos diretos, principalmente por voltametria cíclica, que investiga os centros redox de proteínas onde a troca de elétrons da macromolécula com um eletrodo é direta ou envolve mediadores eletroativos. A capacidade para realizar medidas *in situ* também significa que, com uma célula adequada, é possível determinar potenciais de redução em pressões bastante elevadas, revelando assim, como a compressibilidade estrutural da proteína varia com o estado de oxidação. Outra vantagem da voltametria cíclica repousa no fato de que é possível produzir espécies em potenciais acima dos limites termodinâmicos de uma solução aquosa (-0,4 a 0,8 V Vs EPH em pH=7). A voltametria cíclica apresenta uma resposta voltamétrica que pode fornecer uma identificação da mesma forma que um sinal espectroscópico. Além disso, os métodos voltamétricos são dinâmicos, no sentido de que eles também revelam a cinética e permitem a detecção transitória das espécies em que reação em si é induzida e controlada por diferentes potenciais aplicados no eletrodo (ARMSTRONG, 2001).

As proteínas apresentam um problema específico para a eletroquímica uma vez que, devido a sua interação com os tipos mais comuns de superfícies de eletrodos não produzem respostas eletroquímica significativas. As duas razões mais citadas são: a)

que a estrutura da proteína atue como um isolante, embora recentes opiniões é que seja improvável que a transferência de elétrons constitua um problema, desde que a separação doador-aceptor seja inferior a 14 Å e; b) que a proteína desnature em contato com o eletrodo e exista uma forte adsorção, resultando em um material eletro inativo (ARMSTRONG, 2001).

Moulton et al. (2003), investigaram o uso do rádio marcador iodo-125 e voltametria cíclica para elucidar as características da adsorção de proteínas em eletrodo de ouro. A voltametria cíclica foi utilizada para estudar a adsorção, bem como seus efeitos na camada de proteínas e na transferência de elétrons das espécies eletroativas na superfície do eletrodo.

Qiao et al. (2007), incorporaram duas hemeproteínas (hemoglobina e mioglobina) em micelas de lecitina para formar filmes compósitos em eletrodos de pasta de carbono, e concluíram que esses filmes apresentam rápida transferência de elétrons.

Lu et al. (2008), propuseram um método utilizando voltametria de pulso diferencial em eletrodo de prata modificado com L-cisteína na determinação de HSA (albumina de soro humano), e mostraram que o método apresentou alta sensibilidade, reprodutibilidade e relativa estabilidade.

1.3 Natureza dos centros redox proteicos

As reações de transferência de elétrons são etapas-chave em muitos processos biológicos, tais como fotossíntese, fosforilação oxidativa, metabolismo e fixação do nitrogênio. Entender a função dos peptídeos e proteínas em intermediar as reações de transferência de elétrons a distâncias longas tem implicações físicas, químicas e biológicas fundamentais (DONATO; PELUSO, 1996). Por exemplo, radicais de aminoácidos aromáticos são intermediários-chave na biossíntese do ácido nucléico, reparo do DNA, redução do oxigênio pela citocromo oxidase, oxidação da água pelo PSII (fotossistema II) assim como

outros processos biológicos. Essas reações ocorrem entre centros redox ativos (cofatores orgânicos ou complexos metálicos) unidos por interações físicas intermoleculares dentro das matrizes proteicas. Em muitos casos o contato direto entre o par redox é dificultado pelo enovelamento da proteína. Nesse caso, a transferência de elétrons ocorre através da matriz polipeptídica, uma vez que o par redox está separado por mais de 10 Å. Apesar da distância que o elétron deve atravessar, essa reação é extremamente rápida e acontece com alta especificidade (PROSHLYAKOV et al., 2000).

1.3.1 Metaloproteínas

É um termo utilizado para biomoléculas que utilizam íons metálicos; muitas dessas moléculas são proteínas. Cerca de 30% das enzimas possuem um metal no sítio ativo. Essas metaloenzimas facilitam uma variedade de reações, que incluem a hidrólise catalisada por ácido (realizada pelas hidrolases), reações de oxirredução (oxidases e oxigenases) e o rearranjo de ligações carbono-carbono (sintases e isomerases). Os íons metálicos também apresentam funções estruturais. Por exemplo, os íons Ca^{+2} estão envolvidos no enovelamento de proteínas. As moléculas contendo íons metálicos em geral participam de funções importantes como transporte de elétrons, sítios de armazenamento de metal, ligação e sítio de armazenamento de O_2 e na transdução de sinais (SHRIVER, 2003)

1.3.2 Proteínas desprovidas de grupos prostéticos metálicos

Um grupo prostético é um componente de natureza não-proteica de proteínas conjugadas que é essencial para a atividade biológica dessas proteínas. Os grupos prostéticos podem ser orgânicos (como por exemplo, uma vitamina ou um açúcar) ou inorgânicos (por exemplo, um íon metálico) e encontram-se

ligados de forma firme à cadeia polipeptídica, muitas vezes através de ligações covalentes. Uma proteína desprovida do seu grupo prostético é uma apoproteína, designando-se por vezes a proteína com grupo prostético como holoproteína (NELSON; COX, 2006).

1.4 Proteínas em solução e imobilizadas

Métodos eletroquímicos diretos são aqueles que estudam os centros ativos redox em proteínas, nos quais a troca de elétrons com um eletrodo é direta, e não envolvem mediadores eletroativos. Para ser eficiente a interação entre a proteína e o eletrodo deve cumprir os seguintes critérios: 1) a transferência interfacial de elétrons deve ser rápida, o que requer reorganização de pequenas necessidades energéticas e um acoplamento eletrônico entre o sítio ativo e a superfície do eletrodo, 2) a proteína não deve se desnaturar e 3) as suas propriedades, como atividade catalítica não deve ser prejudicada (ARMSTRONG, 2001).

Um dos principais objetivos da modificação de eletrodos é melhorar a capacidade de reconhecimento e amplificar sinais de corrente, com conseqüente aumento da seletividade pelo efeito eletrocatalítico induzido pelo modificador (ARMSTRONG, 2001).

1.4.1 Estudos eletroquímicos de proteínas em solução

1.4.1.2 Membrana de diálise

Trabalhos anteriores (BIANCO et al.,1997) demonstraram que eletrodos de membrana (ME) possuindo uma proteína aprisionada entre uma membrana de diálise e a superfície de eletrodo, apresentam várias vantagens, dentre as quais:1) são necessários pequenos volumes (2 μ L) de proteínas ; 2) baixo custo e a facilidade de preparação do eletrodo; 3) capacidade

para investigar rapidamente vários parâmetros experimentais e 4) a configuração da fina camada facilita a obtenção das informações quantitativas sobre os processos redox. Além disso, dado que as membranas utilizadas para a construção do ME podem ser carregadas é possível modular o ambiente elétrico próximo gerado, e assim, o papel das interações eletrostáticas na eficiência da transferência de elétrons pode ser determinado (SANTOS et al., 2002).

Eletrodos de membrana (de carbono ou ouro) construídos com membranas de diálise variando em diâmetros de corte e cargas são utilizados para investigar o comportamento eletroquímico de citocromos, especialmente citocromo *c*. A partir de experimentos diretos de voltametria cíclica, o citocromo *c* que exibe respostas eletroquímicas no eletrodo de membrana carregado negativamente (grafite, carbono vítreo, película de mercúrio em carbono vítreo e ouro). Diferentes fatores (pré-tratamento da membrana, efeito de carga, espécies positivas, força iônica, pH, efeito da espessura da camada aprisionada) foram analisados. A resposta eletroquímica do multi-heme citocromos c_3 no eletrodo de membrana é também investigada. É demonstrado que a eletroquímica do citocromo *c* no eletrodo de membrana é essencialmente regida por interações eletrostáticas favoráveis, e que outros fatores (especialmente adsorção e a presença de formas desnaturadas) não desempenham um papel dominante (LOJOU; BIANCO, 2000)

1.4.1.3 Interação com corantes

Investigações da interação de pequenas moléculas com biomacromoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos têm despertado grande interesse nos últimos anos. As pequenas moléculas orgânicas incluem corantes, drogas, produtos químicos tóxicos e assim por diante (SUN, 2002). Corantes solúveis em água, como o azul de metileno, verde de

metileno, metassulfato de fenazina e outros corantes derivados, são imobilizados na superfície do eletrodo como mediadores para catalisar a redução ou a oxidação de biomoléculas (LEI et al., 1996).

Salomi et al. (2005), estudaram a BSA acoplada covalentemente ao corante azul do Nilo, utilizando como agente de acoplamento o EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida), e concluíram que os corantes são mediadores intermoleculares na transferência de elétrons em proteínas e amplificam o sinal para sua detecção.

1.4.2 Proteínas imobilizadas (promotores “cross-linkers”)

Um dos principais objetivos da modificação de eletrodos é melhorar a capacidade de reconhecimento e amplificar sinais de corrente ao passo que a seletividade aumenta pelo efeito eletrocatalítico induzido pelo modificador (LOWINSOHN, 2006)

De forma geral, os métodos mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consistem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água para sua adsorção neste tipo de substrato.

a) Adsorção física à superfície sólida

Plástico, vidro, celulose e ouro, entre outros, têm sido utilizados para adsorção de proteínas através de ligações por forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Essas ligações não são muito estáveis e podem ser facilmente desfeitas por mudanças de pH, temperatura e força iônica. É um método simples e, dificilmente as biomoléculas perdem suas propriedades, porém não é reprodutível (ARAÚJO,

2006). A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

b) Ligações covalentes

Tais ligações levam a uma estabilidade da superfície sensora, sendo resistentes a variações de pH, temperatura e força iônica. A proteína é ligada ao suporte por um determinado grupo funcional, mas durante o processo de ligação pode ocorrer perda de sua atividade (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

c) Filmes poliméricos

Imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo. Ocorrendo uma ampliação da reposta eletroquímica (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

d) Materiais compósitos

Possibilidade de modificação interna do material eletródico. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, cola de silicone, entre outros (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002)

e) Ligações cruzadas:

Este método proporciona a estabilidade da proteína devido à ligação cruzada com reagentes como o glutaraldeído.

Abordagem de ligações cruzadas de proteínas geralmente leva à formação de filmes de proteínas com propriedades de um hidrogel. Estes últimos são materiais poliméricos que apresentam a capacidade de inchar em uma solução aquosa sem se dissolver. Dois tipos de hidrogéis podem ser distinguidos: hidrogéis com ligações cruzadas químicas e físicas. A diferença entre ambos os tipos é a natureza dos pontos ou ramificações da ligação cruzada: ou é uma ligação química ou uma interação física. No último caso,

irão surgir interações iônicas, associações hidrofóbicas. Quando ligações covalentes são incorporadas ao hidrogel, um filme compacto e estável é formado. Para formação do filme, carbodiimidas são geralmente utilizadas, onde se unem com aminas primárias resultando na formação de ligações imidas. Na presença de excesso de união cruzada, a polimerização pode ocorrer porque todas as proteínas contêm carboxilas e aminas (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

1.5 Albumina

1.5.1 Estrutura e função

As albuminas compreendem cerca de 50% da proteína plasmática total e está envolvida na ligação de ácidos graxos e transporte de ânions. Elas servem para controlar a pressão osmótica do sangue bem como para manter a capacidade tamponante do pH do sangue, além de transportar Ca^{2+} , moléculas esteróides, atuam como componente antioxidante celular.. A albumina do soro (Figura 2) tem uma massa molar de aproximadamente 67000 Da. É uma proteína globular típica, com significativa conformação em α -hélice (67%), três domínios (I, II e III), cada um com dois subdomínios (A e B) e considerável estrutura terciária (STEWART et al.,2004).

A albumina sérica bovina (BSA), que é composta de 585 resíduos de aminoácidos, incluindo 17 ligações dissulfeto e uma Cys-34, também age como um transportador e oferece um sítio com potencial de ligação para diferentes íons metálicos e um grupo tiol livre representado por Cys-34 (YAMASAKI; YANA; AOKI, 1999).

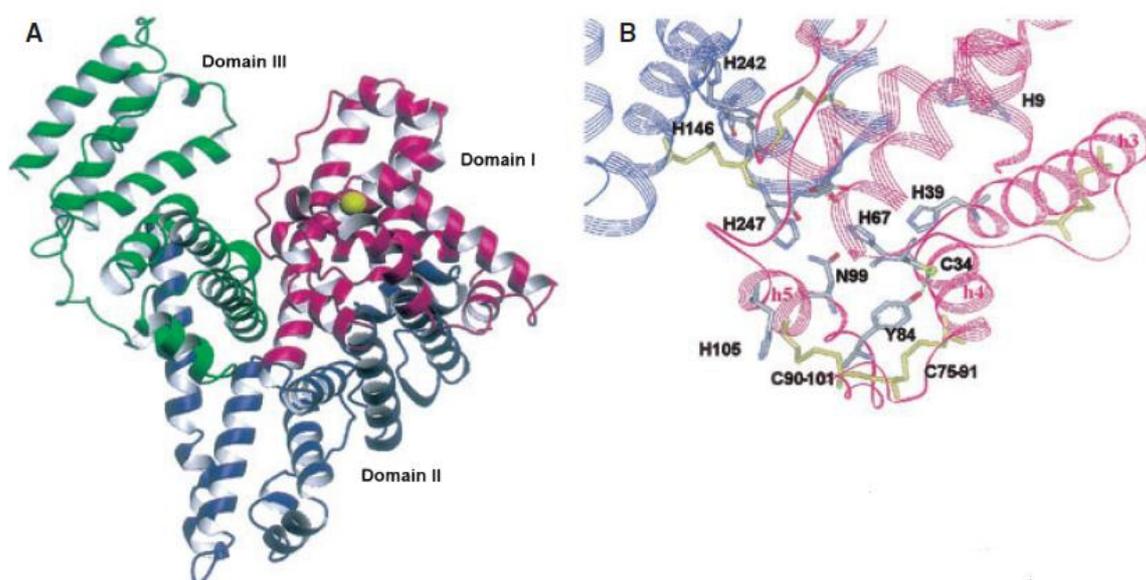


FIGURA 2 – Estrutura da albumina humana, (A) apresentando os três domínios polipeptídios. B - ampliação da estrutura em torno do resíduo de Cys-34.

Fonte: STEWART et al., 2004.

1.5.2 Estudos eletroquímicos de albumina

Voltametria cíclica e espectroscopia de impedância são utilizadas para estudar a adsorção de albumina de soro humano (HSA) na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GC) com potencial de circuito aberto. Essa técnica permite estudar os efeitos da adsorção de proteínas sobre os processos de transferência eletrônica que ocorrem na solução do eletrodo/interface. Na presença de HSA em solução, a cinética de transferência de elétrons da sonda redox de ferricianeto foi reduzida. Isto é devido à formação de uma camada proteica na superfície do eletrodo de carbono vítreo. Essa abordagem foi utilizada para investigar as interações bioquímicas na interface sólido/líquido. Eletrodos modificados com HSA são importantes na análise do tipo de ligação da espécie HSA-ligante e da química redox das moléculas dentro de uma solução de HSA. Mudanças no potencial de oxidação/redução utilizando esse método podem ser usadas como forma de distinguir entre interações hidrofóbicas e

não-hidrofóbicas (eletrostática e/ou covalente) de ligantes com albumina (HELI et al., 2007).

Eletrodos condutores de boro-diamante dopados (BDD) foram utilizados com sucesso para detecção eletroquímica direta de proteínas, incluindo BSA e um marcador de câncer, IAP(proteína inibidora de apoptose). A voltametria cíclica sugere que cisteína, tirosina e triptofano contribuíram para a direta oxidação eletroquímica nos eletrodos BDD (CHIKU et al., 2008).

1.6 Ligações covalentes em proteínas

A cisteína pode estabelecer uma ligação cruzada com outro grupo de sulfidril de cisteína, na mesma ou em outra cadeia polipeptídica, oxidando-se e dando uma ligação covalente de dissulfeto. No estado reduzido, um resíduo de cisteína pode servir como sítio para a ligação do substrato em várias proteínas enzimáticas (NELSON; COX, 2006). Nesse sentido, compostos com deficiência de elétrons, como quinonas reativas podem tornar candidatos a mediadores covalentes para a transferência de elétrons em proteínas.

1.7 Dopamina

1.7.1 Estrutura, função e metabolismo.

A dopamina (DA), 2-(3,4-dihidroxi-fenil)-etilamina, cuja estrutura é mostrada na Figura 3, é um importante neurotransmissor do grupo das catecolaminas, sendo precursor metabólico imediato da noradrenalina. Além disso, a dopamina é comumente empregada em unidades de emergência hospitalar como agente vasoconstritor e hipertensor (COSTA et al., 1998).

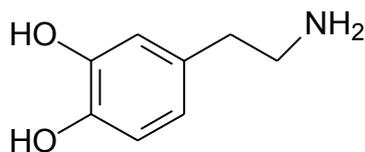


FIGURA 3- Estrutura da dopamina.

A dopamina é sintetizada nos neurônios a partir do aminoácido tirosina, o qual é hidroxilado pela enzima tironase hidroxilase a L-DOPA. Posteriormente, a L-DOPA é descarboxilada para formar a dopamina pela ação da enzima dopa carboxilase para então ser armazenada nas vesículas dos terminais pré-sinápticos. É encontrada no sistema límbico e no hipotálamo entre outros e suas funções, de modo geral, são: (i) controle motor (sistema nigrostriatal, responsável por 75% da dopamina do cérebro); (ii) efeitos comportamentais; e (iii) controle endócrino. Sua concentração no plasma sanguíneo é menor que $0,7 \text{ nmol.L}^{-1}$ (CALBREATH, 1992).

Entre as implicações patológicas relacionadas com a dopamina está a doença de Parkinson, que é um distúrbio motor progressivo, ocorrendo com maior frequência em pacientes idosos, cujos principais sintomas são a rigidez e o tremor, associado a uma extrema lentidão para iniciar movimentos voluntários (hipocinesia). É sabido que o mal de Parkinson está associado a uma deficiência de dopamina nas vias nigrostriatais (LAAR et al., 2009).

Em 1985, foi proposta a “teoria da dopamina” sugerindo que uma concentração alta de dopamina no cérebro é responsável pelos delírios e alucinações característicos de portadores de esquizofrenia (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação dessa substância, como os cromatográficos, espectrofotométricos e eletroquímicos. Os eletroquímicos têm sido muito utilizados por apresentar sensibilidade e seletividade na determinação de vários analitos. Estes métodos geralmente não necessitam de pré-

purificação e, conseqüentemente, reduzem o custo das análises (SUN, 2006).

Recentemente, vários trabalhos têm surgido na literatura com o objetivo de explorar a modificação química da superfície de eletrodos sólidos convencionais para a determinação de neurotransmissores em fluidos extracelulares do sistema nervoso central, em virtude do fato de muitas doenças, dentre elas o Mal de Parkinson e a depressão, estarem relacionadas com anormalidades no nível de dopamina nas sinapses dos neurônios (ZHANG, 2008).

O emprego de eletrodos quimicamente modificados ou então de metodologias que conciliam o emprego de micro eletrodos e da voltametria cíclica estão voltados para o propósito de se eliminar a interferência do ácido ascórbico (10^{-4} - 10^{-3} mol. L⁻¹), o qual coexiste com a dopamina (10^{-8} – 10^{-6} mol. L⁻¹) no fluido cerebrospinal em concentrações elevadas, e também sofre oxidação na mesma região de potenciais que a dopamina (TOLEDO, 2006).

A determinação simultânea de dopamina e de ácido ascórbico foi estudada por Sun (1998) e colaboradores com a utilização de um eletrodo de carbono vítreo modificado pela eletrodeposição de um filme vermelho neutro. A determinação simultânea pode ser realizada usando a diferença das correntes catalíticas referentes a cada composto. A determinação de dopamina, na presença de ácido ascórbico, foi realizada pela utilização de um eletrodo de carbono vítreo contendo um filme de vermelho de acridina eletrodepositado. Os resultados indicaram que a separação dos picos de oxidação de ambos os compostos é alcançada por interações eletrostáticas favoráveis entre o filme e a dopamina (ZHANG et al., 2003)

Alteração do metabolismo normal da DA pode conduzir a elevadas concentrações deste neurotransmissor, assim, acelerar a sua auto-oxidação nos compartimentos celulares em que a sua concentração tem aumentado (BINDOLI et al., 1992). A auto-

oxidação *in vivo* da DA produz: DA-quinonas, radicais superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, os quais geram estresse oxidativo, contribuindo para a citotoxicidade da DA (GRAHAM et al,1978). DA-quinonas são espécies deficientes de elétrons que podem ser ligadas covalentemente a nucleófilos celulares, tais como grupos sulfidrila, na cisteína livre, glutatona reduzidos (GSH), e resíduos de cistenil em proteínas. Esse mecanismo de auto-oxidação é facilitado pela presença de catalisadores, como íons metálicos de transição (PATTISON, et al, 2002). Com efeito, foi demonstrado que traços de íons metálicos tais como Cu^{2+} , podem acelerar a auto-oxidação de hidroquinonas (NAKAMURA et al., 2003).

Na Figura 4, estão resumidas as etapas da biossíntese da dopamina.

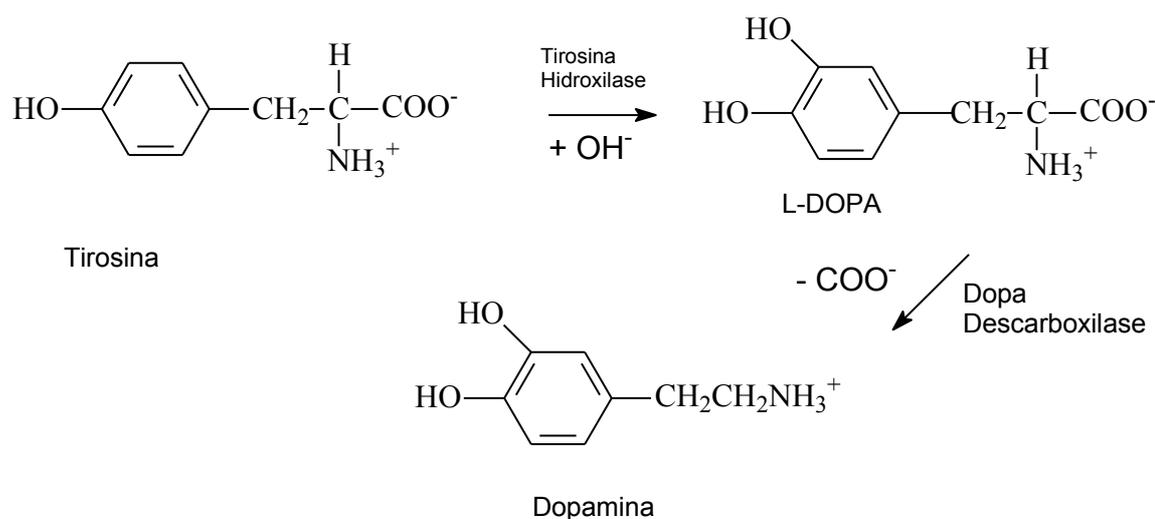


FIGURA 4 - Etapas da biossíntese da dopamina.

1.7.2 Complexação *in natura* de dopamina e impactos clínicos

Em 1985, Carlsson, e seus associados relataram a ocorrência de um novo metabólito da dopamina, 5-S-cisteinildopamina (5-S-Cys-DA), em certa região dopaminérgica do cérebro de mamíferos, incluindo o núcleo caudado, *globulus palidus* e substância negra. O interesse por esse metabólito

aumentou regularmente durante os subsequentes anos em virtude do seu possível significado como um índice de estresse oxidativo em processos de envelhecimento e em transtornos neurodegenerativos, como a doença de Parkinson. Estudos pelo grupo sueco revelou um aumento gradual na proporção de 5-S-Cys-DA/dopamina na substância negra humana com o aumento da degeneração e despigmentação, de um valor de 0,0254 em indivíduos normais para 0,174 em doentes de Parkinson. Um aumento similar em 5-S-Cys-DA foi observado no *striatum* de cobaias de porcos adultos ou após a alimentação com dieta deficiente em ascorbato. O tratamento com reserpina aumentou a pré-sináptica de circulação de dopamina pela inativação do mecanismo de armazenamento em vesículas, também causou aumento na formação 5-S-Cys-DA. Em anos mais recentes, 5-S-Cys-DA chamou a atenção como um suposto precursor da neuromelanina, um pigmento característico que ocorre nos neurônios dopaminérgicos localizado na parte compacta da substância negra. Baseado em estudos de degradação da substância negra neuromelanina humana purificada, Rorsman, e seus associados sugeriram que o pigmento é uma mistura de copolímeros derivados da oxidação da dopamina e 5-S-Cys-DA. Bioquimicamente, 5-S-Cys-DA se forma a partir da adição de cisteína ou uma cisteína contendo tiol à dopamina-quinona (Figura 5) (PALUMBO et al.,1995).

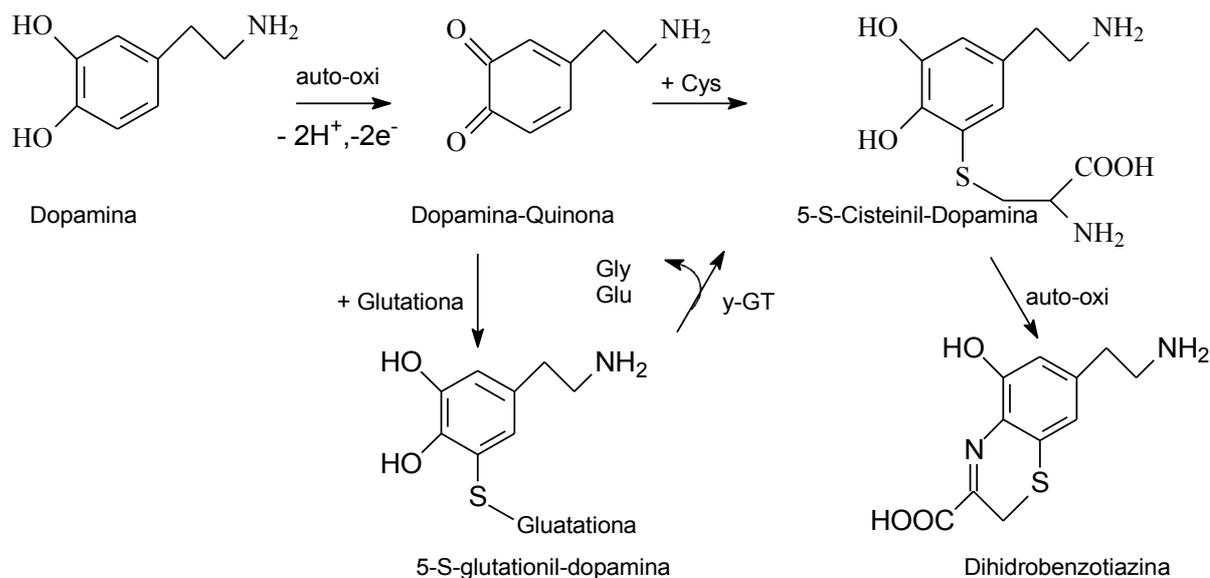


FIGURA 5- Auto-oxidação da dopamina.

1.7.3 Eletro-oxidação da dopamina

1.7.3.1 Noções gerais

A principal característica do principal produto da oxidação de catecóis; *orto*-quinona (Figura 6) é sua deficiência em elétrons e, portanto, altamente reativa frente a grupos nucleófilos. A maior parte facilmente disponível nucleófilo no lado da cadeia do grupo amino da *orto*-quinona, por isso uma intraciclização tem lugar em pH neutro, como é mostrado para a dopamina-*o*-quinona (DANIEL et al., 1975).

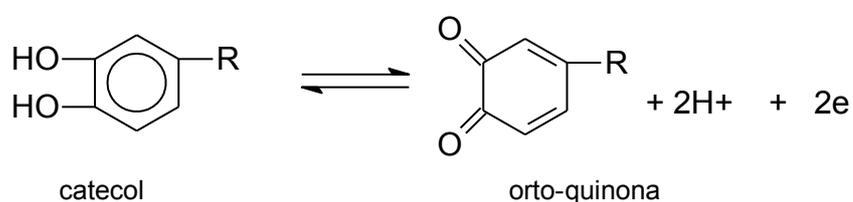


FIGURA 6 - Oxidação do catecol produzindo o-quinona

Onde R = CH₂CH₂NH₂ = dopamina
 = CH(OH)CH₂NH₂ = norepinefrina
 = CH₃ = 4-metilcatecol.

O produto inicial da ciclização (Figura 7) é o leucocromo, de certa forma, mais fácil de ser oxidado do que o catecol inicial, por isso, a oxidação tem prosseguimento até o bem conhecido aminocromo, nesse caso, dopamina-cromo (DANIEL et al.,1975).

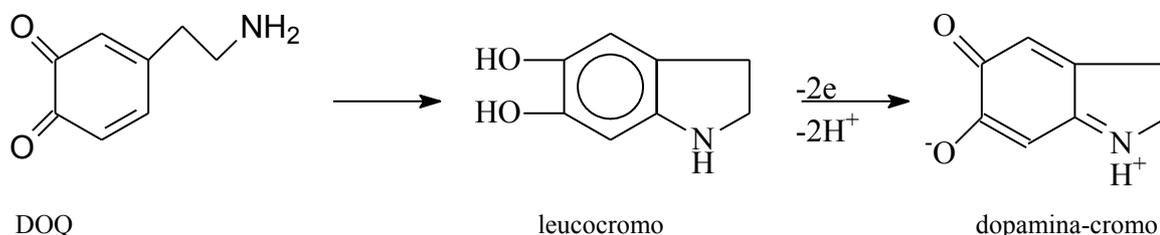


FIGURA 7–Intraciclização da dopamina-o-quinona.

Essa ciclização intramolecular é exatamente um caso especial de reações nucleofílicas da orto-quinona. Apesar da disponibilidade direta da etilamina no lado da cadeia, um nucleófilo externo pode facilmente competir com a intraciclização como mostra a Figura 8, com:

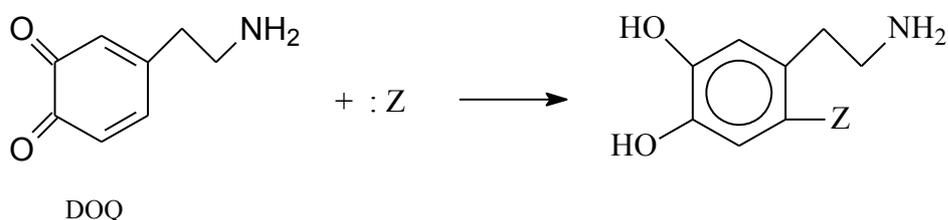


FIGURA 8- Representação do ataque nucleófilo (: Z) a dopamina-orto-quinona.

- a) Intraciclização formando aminocromos.
- b) A nova redução do catecol de origem por redutores endógenos, (qualquer das reações anteriores, a ou b, podem ocorrer).

A partir de uma dessas reações pode-se predizer que possíveis caminhos para descobrir as conseqüências das reações oxidativas *in vivo* ou produtos ligados covalentemente *in vitro*. Existem poucos dados quantitativos desses caminhos de reação, pela sua rapidez e complexidade em condições fisiológicas (DANIEL et al.,1976).

1.7.3.2 Formação de 5-S-Cys-dopaminocromo

Recentes trabalhos descrevem a influência da L-cisteína na oxidação química *in vitro* do neurotransmissor catecolaminérgico dopamina em pH neutro. Esses resultados mostraram que a L-cisteína modifica o caminho normal de oxidação da dopamina formando o polímero preto/marrom melanina por meio da oxidação do produto formado do neurotransmissor, dopamina-*orto*-quinona para formar inicialmente 5-S-cistenil-dopamina (5-S-Cys-DA, produto principal) e 2-S-cistenil-dopamina (2-S-Cys-DA, produto secundário) Figura 9.

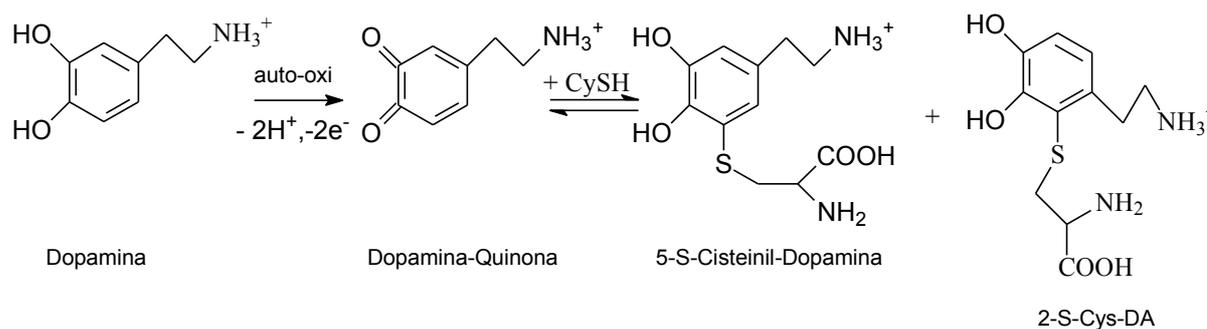


FIGURA 9 – Oxidação da DA, com formação de dopamina-quinona e 5-S-cistenildopamina e 2-S-cistenildopamina

1.7.3.3 Aplicações de dopamina complexada para estudos eletroquímicos em proteínas

Uma das aplicações está relacionada à prevenção de doenças causadas pela falta ou excesso de dopamina, buscando o desenvolvimento de sensores eletroquímicos estáveis e com alto grau de seletividade, para possibilitar a construção de dispositivos portáteis de fácil manipulação e também na miniaturização do sistema na tentativa de se determinar *in vivo*, bem como outras moléculas de interesse biológico. Na área neurológica, surge a possibilidade de desenvolvimento de sensores específicos para drogas que atuam no sistema nervoso central, o que possibilitará estudos

de interação destas drogas com os neurotransmissores, levando ao esclarecimento de dúvidas que persistem, como por exemplo, o quanto as drogas afetam o comportamento e o metabolismo dos usuários (TOLEDO, 2006).

Neste trabalho, contudo, visamos estudar a complexação de dopamina com proteínas, especificamente a albumina de soro bovino, BSA, como um modelo para exploração eletroquímica de características morfo-funcionais de proteínas desprovidas de centros prostéticos de transferência de carga.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o complexo dopamina – albumina em eletrodo de pasta de carbono simples, como um modelo de etiquetagem eletroquímica para estudos de proteínas.

2.2 Específicos

- Calibração de potenciostato para estudos de voltametria cíclica
- Determinação de grupos tióis em BSA com DTNB.
- Isolamento proteico dos complexantes em excesso por cromatografia de filtração em gel e por diálise.
- Ciclovoltametria de BSA inibida com N-etilmaleimida.
- Complexação de dopamina com BSA.
- Ciclovoltametria de dopamina.
- Ciclovoltametria de BSA-dopaminocromo.
- Determinação de parâmetros eletrocatalíticos do aducto proteico de dopamina.
- Espectrofotometria de primeira derivada de BSA-dopaminocromo.
- Espectrofluorimetria de BSA-dopaminocromo

3 JUSTIFICATIVA

O estudo eletroquímico de proteínas tem sido feito ao longo das últimas décadas com modelos experimentais constituídos essencialmente de metaloproteínas, tais como pigmentos respiratórios e metabólicos, incluindo hemoglobinas, mioglobinas, citocromos e azurina (proteínas contendo cobre).

A identificação e estudos de proteínas desprovidas de centros metálicos é praticamente inexistente na literatura. Paralelamente, a vasta gama de eletrodos definidos para tal são elaborados com alterações estruturais (pasta de carbono, metais, diamante e carbono vítreo modificado) que limitam o seu emprego (custos, volume de amostra, entre outros). Dessa forma, foi utilizada a metodologia de complexação de dopamina com BSA devido às características de 1) fácil construção do eletrodo (pasta de carbono simples) e 2) sua adaptação a diferentes volumes de amostra, 3) obtenção de quantidades expressivas do complexo para análise voltamétrica, 4) resposta eletroquímica sensível à voltametria cíclica, 5) facilidade relativa para comparação da resposta com biomoléculas com grupo funcional tiol (cisteína, glutatona), 6) além da não necessidade da macromolécula alvo apresentar grupos redox prostéticos ou metálicos, tais como o de metaloproteínas (mioglobina, hemoglobina, citocromos, ferredoxina, dentre outros), geralmente empregados nos estudos clássicos de voltametria de proteínas.

Nesse sentido, tem o presente trabalho o objetivo de avaliar a possibilidade de uma marcação estável em proteínas para estudo eletroquímico, utilizando um modelo de complexação de BSA com dopamina, e sensor formado por eletrodo de pasta de carbono não modificado.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

N-etilmaleimida (NEM), dopamina (DA), e albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, E.U.A.), sem purificação adicional. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico PA. Água bidestilada foi utilizada no preparo das soluções. Soluções estoque de reagentes foram preparadas pela dissolução de uma quantidade exata de cada composto em água bidestilada e armazenadas na geladeira em local escuro. BSA foi determinada a partir do seu coeficiente de extinção molar em 279 nm (0,667 a 1%)(CARLSON ; ROOKE, 2008).

O derivado NEM-BSA foi preparado reagindo NEM com BSA na proporção molar de 5:1 em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ em pH de 7,4 por 3 dias a 40 °C com agitação. Em seguida foi feito a diálise da solução.

4.2 Determinação grupo tiol (-SH) livre

Tiois totais foram determinados usando o reagente de Ellman's[ácido d 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)] (ROTMAN; DALY; CREVELING, 1976). Para esta análise foram adicionados volumes entre 10 e 150 µL de amostras de BSA preparadas em tampão fosfato de sódio 0,1 mol. L⁻¹ pH de 7,4 . A estas amostras foram adicionados 200 µL de DTNB 0,010 mol.L⁻¹. A absorvância foi medida espectrofotometricamente em 412 nm devido ao produto resultante da reação do grupo tiol com DTNB que gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela. Os valores foram calculados por comparação com solução padrão de L-cisteína (10⁻⁵ - 1,5. 10⁻⁴ mol. L⁻¹).

O mesmo procedimento foi realizado para o complexo BSA-Dopaminocromo utilizando-se os volumes de 100 μL do complexo.

4.3 Formação do complexo entre DA e BSA

Várias proporções molares de DA e BSA foram testadas em temperaturas (5, 15, 25, 37, 45 $^{\circ}\text{C}$), períodos (5 a 240 minutos) e emprego de catalisadores metálicos (ferro, cobre, magnésio, 10^{-3} a $5 \cdot 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), com a melhor condição experimental monitorada como segue. A ligação de dopamina com BSA foi realizada misturando soluções $1,6 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de BSA com uma solução $8 \cdot 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de DA no mesmo tampão a 37°C por 2 h. As amostras foram dialisadas com uma membrana de celulose (Spectrapore, limite de corte 6000-8000 uma, Spectrum Laboratories, Inc, CA), durante 24 h, com um período de 2 h para a mudança do tampão, exceto sob *overnight*. Posteriormente, o conteúdo das membranas foi suavemente retirado para evitar a oxidação e desnaturação da proteína. Em seguida, aplicou-se esta mistura a uma pequena coluna Sephadex G-25 (0,7 cm x 15 cm) equilibrada com tampão fosfato. As soluções foram eluídas com o mesmo tampão e as frações correspondentes aos principais picos cromatográficos foram coletadas separadamente (frações de 1,5 mL) e imediatamente mantidas a 5 $^{\circ}\text{C}$ antes dos ensaios eletroquímicos e espectroscópicos.

4.4 Calibração do potenciostato / galvanostato p-39 omnimetra.

Foi utilizado ao longo do experimento um sistema potenciostato/galvanostato PG-39MCSV, Omnimetra Instrumentos Científicos Ltda (Nova Friburgo, Rio de Janeiro). O sistema PG-39 foi devidamente calibrado empregando-se o registro elétrico e químico do sinal de corrente obtido em ensaios distintos. Para o primeiro foi conectada as extremidade das garras RE1-WE e RE2-CE um resistor de 100Ω , seguindo-se rampa linear de -0,1 a +0,1 V a 100 mV/s. A inclinação de gráfico potencial aplicado por

corrente resultante obtida foi contrastada com o valor do resistor empregado.

Para a calibração química foi empregado 5 mL de solução de ferricianeto de potássio $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ seguindo-se a imersão da superfície de contato dos eletrodos de trabalho (pasta de carbono e carbono vítreo), auxiliar (platina) e de referência (Ag/AgCl), próximos um do outro, para monitorar o sinal eletroquímico. Esse foi obtido por voltametria cíclica a 200 mV/s e faixa de $-0,2$ a $+0,6 \text{ V}$. O sinal de reversibilidade característico foi utilizado como critério para análises paramétricas ulteriores dos eletrodos, como potencial de pico anódico e catódico.

4.5 Voltametria cíclica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula padrão de três eletrodos utilizando um potenciostato PG39MCSV: galvanostato (Omnimetra Instr. Científicos Ltda, RJ, Brasil), e $0,1 \text{ M}$ de tampão fosfato de sódio pH de 7,4 como solução eletrolítica. Um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência, e um fio de Pt como eletrodo auxiliar. O eletrodo de trabalho foi construído por uma mistura 70:30(m/m) de grafite (99,9% de pureza, Fluka, St. Louis, E.U.A.) com Nujol (Mantecorp, RJ, Brasil). O intervalo do potencial aplicado foi de -300 a $+600 \text{ mV}$, em uma velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} . Todas as soluções foram previamente desareadas com fluxo de nitrogênio durante 5 minutos para remover oxigênio antes do início dos experimentos. Ensaio de variação de pH foram conduzidos em soluções tamponadas a $0,1 \text{ M}$ de acetato (pH 3, 4 e 5) ensaios de variação de pH foram também conduzidos em soluções tamponadas a $0,1 \text{ M}$ de acetato (pH 3, 4 e 5), fosfato (pH 6 e 7) e Tris-HCl (pH 8, 9 e 10) em temperatura ambiente.

4.5.1 Caracterização ciclovoltagemétrica de dopamina

Foram realizadas medidas de CV para verificar o comportamento eletroquímico da dopamina, bem como seus potenciais de oxidação e redução. As medidas foram feitas com dopamina na concentração de $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 100mV/s, entre -0,3 e 0,6 V. Os dados amperimétricos foram corrigidos por subtração da linha de base. Os seguintes ensaios também foram conduzidos sob essa montagem:

1. Medidas voltamétricas cíclica em função da concentração de dopamina, variando-se essas últimas em 0,2; 0,5; 1,9; 2,0; e $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2. Estudo do efeito de velocidade de varredura de potenciais entre 50 e 300 mV/s para $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato no intervalo acima (WANG et al., 2005).

3. Medidas voltamétricas na mistura de dopamina, juntamente com L-cisteína e ácido ascórbico na proporção molar de 1:1:1 bem como de uma mistura de dopamina e L-cisteína (1:1 em mol), para verificar o efeito de ácido ascórbico na oxidação/redução da dopamina entre -0,3 e 0,6 V a uma velocidade de 100 mV/s.

4. Eletro-oxidação de dopamina aplicando-se potenciais de 0,05; 0,20; 0,30; e 0,60 V durante 20 minutos.

4.6 Espectrofotometria

As mudanças nas propriedades ópticas dos aductos de proteínas foram estudadas usando espectrofotometria de primeira derivada e espectroscopia de fluorescência. O espectro de absorção das soluções de amostra contendo DA ou DA-BSA foi obtido pelo instrumento S22 (Biochrom Ltda, St. Albans, UK), com

caminho óptico de 10 mm para a célula e fenda de 2 nm. Os dados dos espectros de absorção armazenados em um computador foram convertidos à primeira derivada após suavização do sinal com função de 11 pontos de Savitzky-Golay em intervalos de 1 nm de comprimento de onda. Os dados obtidos em triplicata foram analisados com o pacote estatístico Origin 8.0 (OriginLab Co, Northampton, MA, E.U.A.).

4.7 Espectrofluorimetria

As medidas de fluorescência foram realizadas em células de quartzo de 10 mm² utilizando-se o instrumento Cary Eclipse (Varian Inc, Palo Alto, CA, EUA). Os espectros de emissão foram realizados em 300 a 500 nm, determinando-se a intensidade do pico em 279 nm. Um espectro controle obtido antes da adição da proteína foi subtraído do espectro de emissão das misturas.

4.8 Análise de dados

Os dados eletroquímicos foram coletados em varreduras de 5 ciclos cada, sendo considerado para análise apenas o terceiro ciclo, com os valores utilizados para aferição qualitativa da mudança de mecanismo de reação. Todos os dados foram analisados por meio de ajuste linear por mínimos quadrados e procedimentos de suavização. Os gráficos foram representados com auxílio do pacote gráfico e estatístico Origin, versão 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada em 22 °C, e os ensaios de complexação de dopamina com albumina, ciclovoltametria e cromatografia de exclusão molecular, em quintuplicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinações de grupos tióis com DTNB

A Figura 10 mostra as curvas analíticas na determinação de grupos tióis de L-cisteína, BSA e BSA- NEM. Utilizando dados dessas curvas foi calculado a relação entre as concentrações dessas substâncias e o grupos tiol livre. Em relação a L-cisteína foi encontrado um valor de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para a BSA foi de $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e, para BSA-NEM o valor encontrado foi de $0,0 \pm 0,0 \mu\text{M}$, sugerindo que houve complexação entre BSA e N-etilmaleimida, bloqueando o grupo tiol do resíduo de Cys-34 presente na BSA (ROTMAN; DALY; CREVELING, 1976).

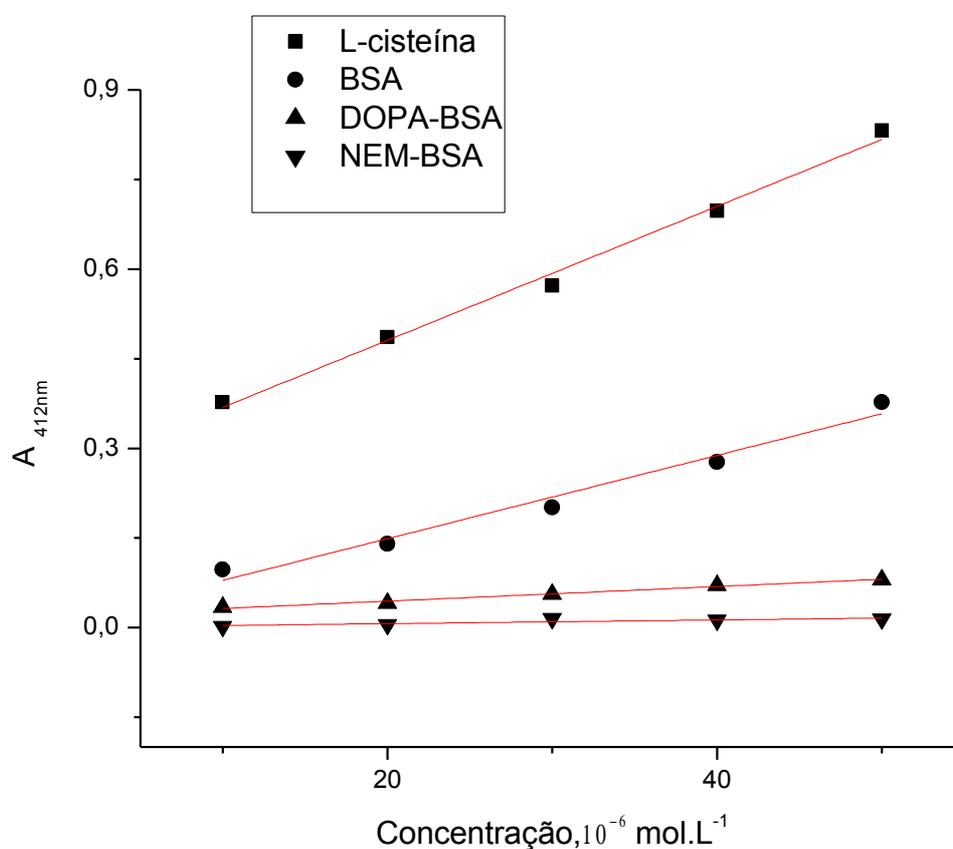


FIGURA 10 – Curvas analíticas de DTNB com L-Cys, BSA e BSA complexada com N-etilmaleimida.

5.2 Ciclovoltametria de dopamina

A Figura 11 corresponde aos dados ciclovoltamétricos de oxi-redução de dopamina e DA-o-quinona sobre eletrodo de pasta de carbono. Através do voltamograma foram observados os potenciais de pico de oxidação e redução desta molécula orgânica, em 214 mV e -5,7 mV, respectivamente. O valor de E° calculado foi de 104 mV. O valor de E_{pa} encontrado está de acordo com o valor determinado por ARDAKANI et al. (2009), que é de 215 mV.

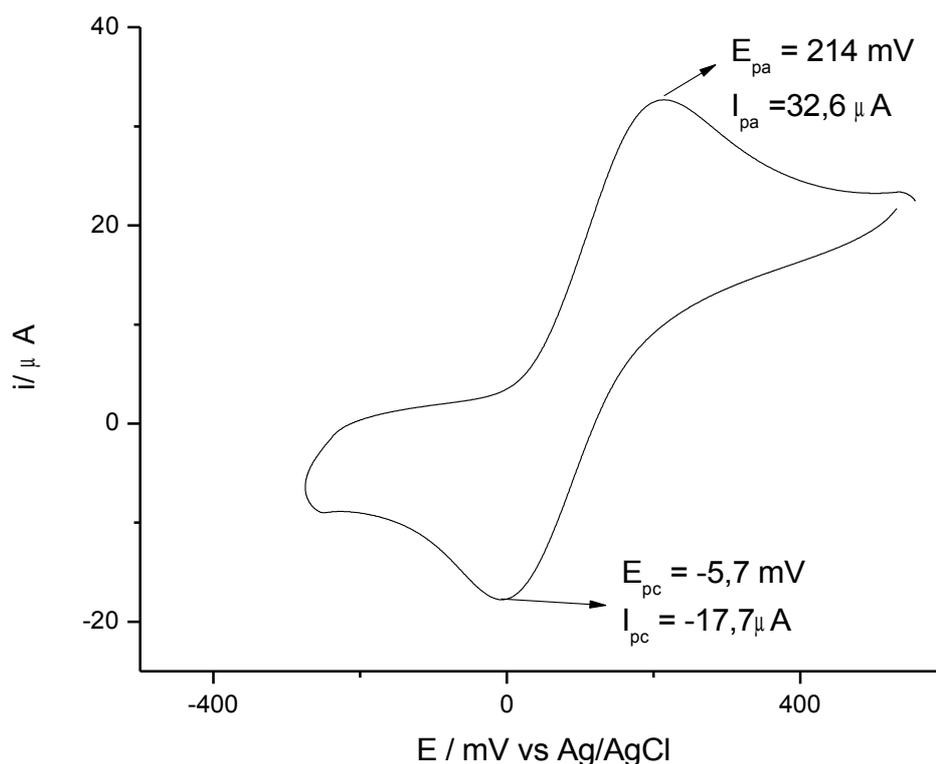


FIGURA 11 – Voltamograma cíclico da dopamina ($8,3 \times 10^{-5} M$), em solução tampão fosfato pH de 7,4 em eletrodo de pasta de carbono a velocidade de varredura de 100 mV/s.

A velocidade de varredura foi variada de 50 a 300 mV/s, com o objetivo de avaliar a reversibilidade e a natureza do transporte

do material eletroativo para a superfície do eletrodo. Na Figura 12 são apresentados os voltamogramas cíclicos, em diferentes velocidades de varredura de uma solução $8,3 \cdot 10^{-6}$ M de dopamina em tampão fosfato 0,1 M com pH igual a 7,4. No intervalo de velocidade estudado, foi possível observar uma variação linear do potencial de pico com o aumento da velocidade de varredura, o que é indicativo da reversibilidade da reação de oxidação da dopamina (SANTOS, 2007).

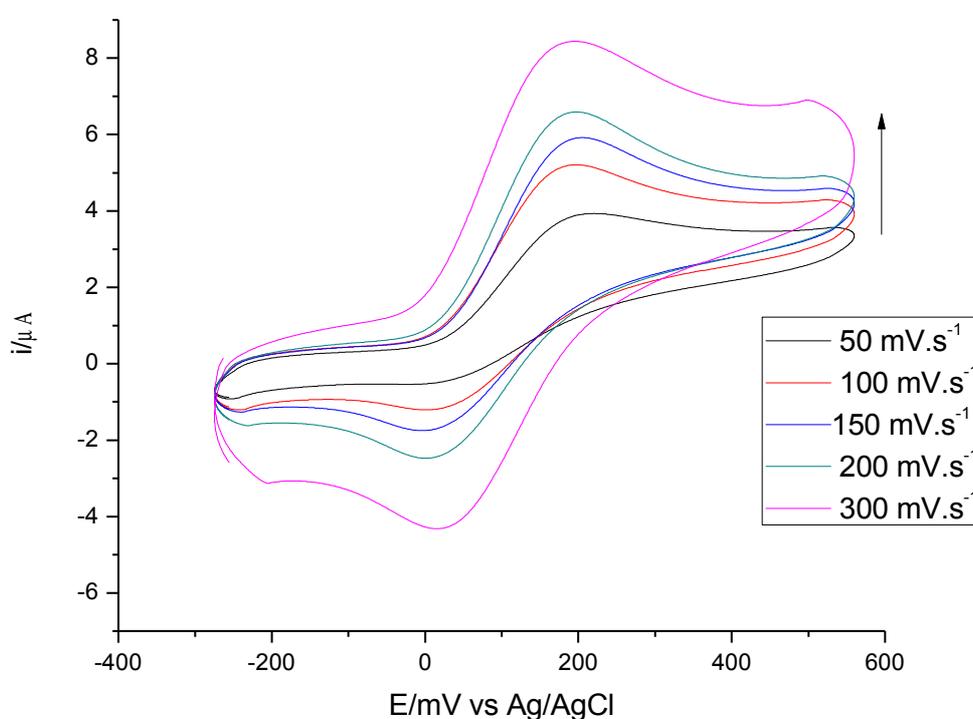


FIGURA 12 – Voltamograma cíclico de dopamina ($8,3 \cdot 10^{-6}$ M) obtido com eletrodo de pasta de carbono em velocidade de varredura entre 50 e 300 mV/s em tampão fosfato pH igual a 7,4 ($R^2=0,981$).

A Tabela 1 apresenta alguns parâmetros eletroquímicos para a dopamina. A partir da variação dos valores de ΔE_p com a velocidade de varredura, mostrado na Tabela 1, podemos verificar que neste caso, a oxidação eletroquímica da dopamina é um processo quase-reversível controlado por transferência de massa. Contudo, o comportamento da razão $|i_{pc}/i_{pa}|$, pode indicar a

presença de uma reação química acoplada (CORONA; AVENDAÑO , 2007).

TABELA 1

Variação dos parâmetros voltamétricos em função da velocidade de varredura do potencial (v) correspondente ao CV da figura 12.

v(mV/s)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	i_{pa} (μ A)	i_{pc} (μ A)	$ i_{pc}/i_{pa} $
50	213	5,2	207,8	3,9	-0,5	0,12
100	196,4	3,8	192,6	5,2	-1,4	0,26
150	201,9	2,0	199,9	5,9	-2,0	0,33
200	196,7	2,7	194	6,6	-2,8	0,42
300	194,4	4,9	198,5	8,4	-4,8	0,57

A natureza do transporte de massa que governa o processo redox pôde ser conhecida pela relação entre I_p vs $v^{1/2}$ (Figura 13). Uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura é um indicativo da adsorção de moléculas do reagente e/ou produtos na superfície do eletrodo e sugere que o processo pelo qual os analitos chegam à superfície do eletrodo é difusional. O processo se deve ao gradiente de concentração existente entre o seio da solução e a superfície do eletrodo (SANTOS, 2007).

A despeito do caráter difusional e de reversibilidade da transferência de carga, alguns parâmetros eletroanalíticos foram determinados com o intuito de se monitorar sua variação nos aductos de dopamina. Esses parâmetros consistiram no coeficiente de heterogeneidade padrão, k^0 , e o coeficiente de transferência de carga α (WANG, 2001).

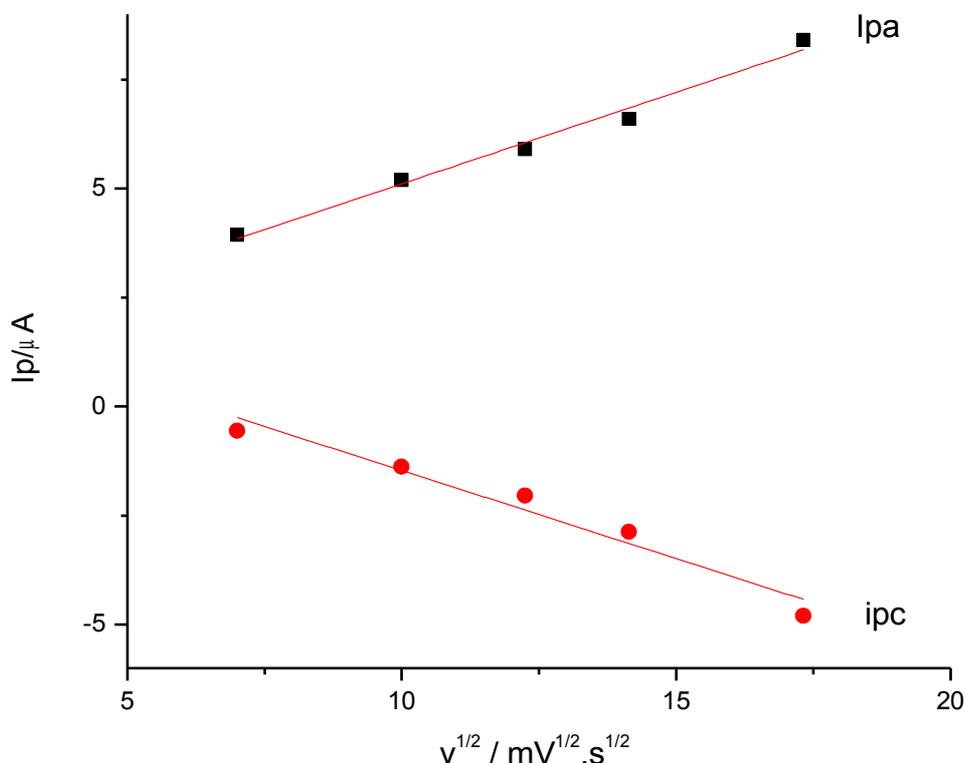


FIGURA 13 – Correntes de pico anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. ($R^2 = 0,981$ para I_{pa} e $R^2 = 0,946$ para I_{pc}).

A Figura 14 mostra os voltamogramas cíclicos da dopamina em função da concentração. Foi possível observar que houve um aumento da corrente de pico anódica com o aumento da concentração de dopamina de $30 \mu\text{A}$ a $123 \mu\text{A}$. Este comportamento pode indicar que as cargas anódicas envolvidas neste processo aumentam, e conseqüentemente o produto oxidado. Complementarmente, a Figura 14 sugere uma mudança de comportamento de superfície de resposta dos eletrodos, de uma cinética quase-reversível a irreversível (TOLEDO, 2006).

Com um coeficiente de determinação linear igual a 0,99 (inserto da Figura 14), sugere-se que o eletrodo de pasta de carbono utilizado na determinação da dopamina neste trabalho possui potencialidades para aplicações analíticas.

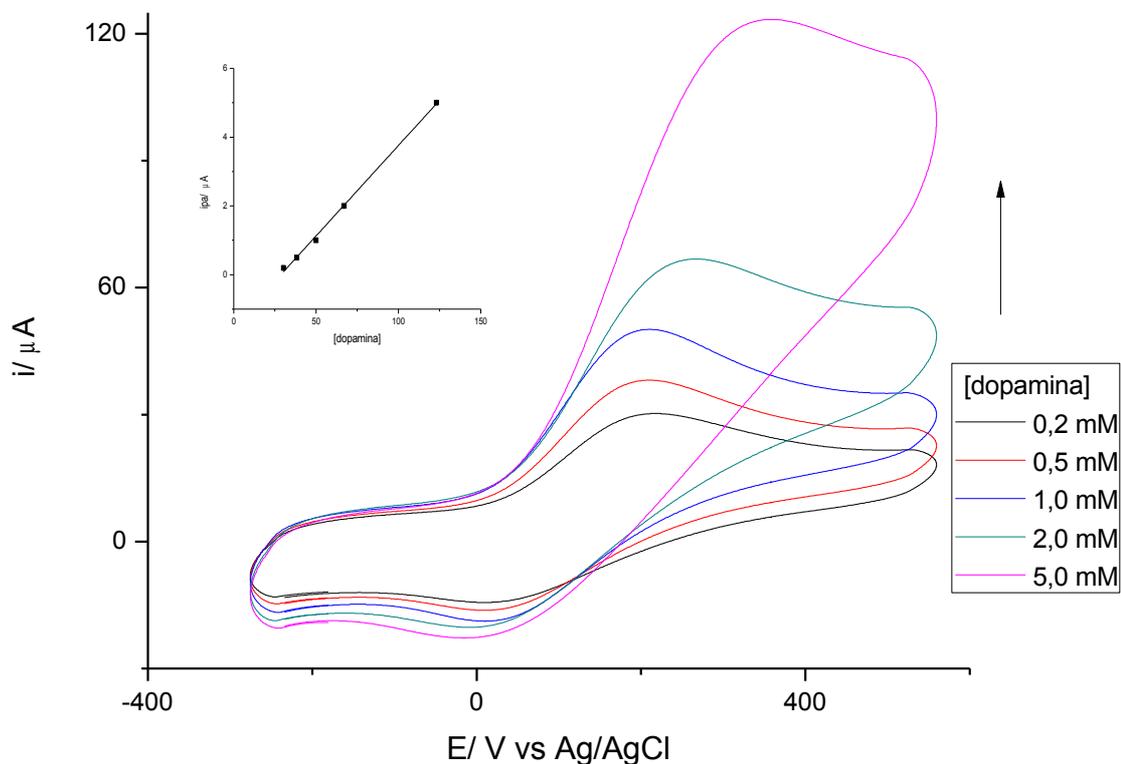


FIGURA 14 - Voltamograma cíclico da dopamina variando a concentração de 0,2 mM a 5,0mM com inserto $I_{pa} \times [\text{dopamina}]$ ($R^2 = 0,99$), no intervalo de potencial de -0,3 V a 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s em pH de 7,4.

A Figura 15 mostra a curva cronoamperométrica da eletro-oxidação de dopamina onde se pode visualizar o consumo do analito na superfície do eletrodo em até 20 minutos, dependendo do potencial aplicado e aparecimento de dopaminocromo pela curva de eletro-oxidação de dopamina (ALFARO et al.,1995).

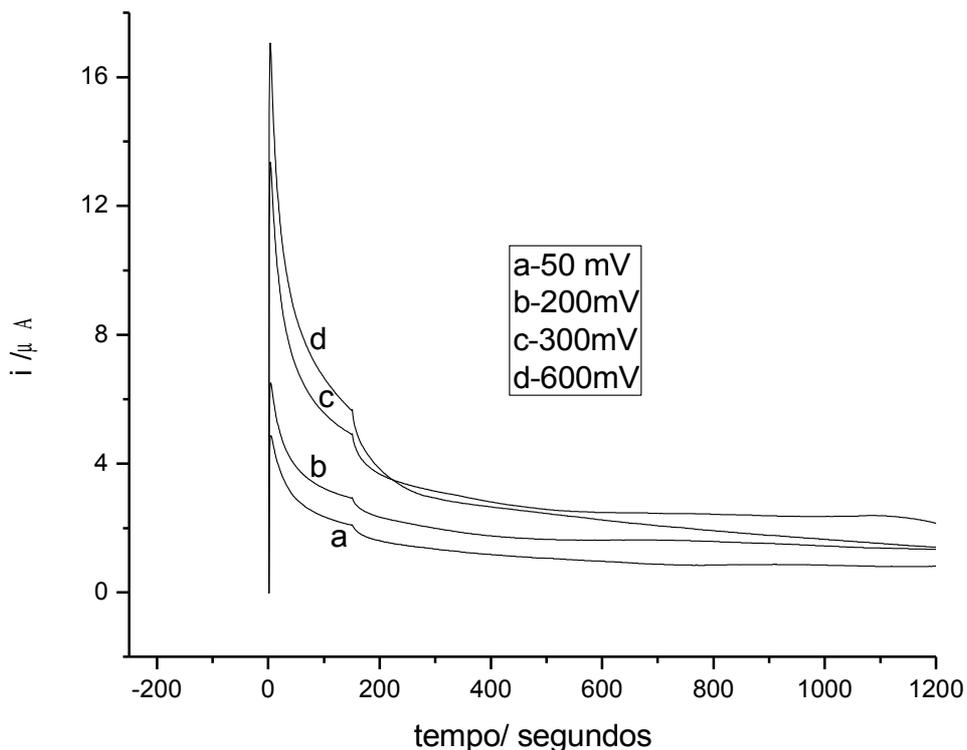


FIGURA15-Cronoamperometria de eletro-oxidação da dopamina em diferentes potenciais aplicados.

A Figura 16 mostra os voltamogramas cíclicos da dopamina antes e após sua eletro-oxidação a 0,6 V durante 20 minutos. Podemos perceber a mudança, tanto da corrente de pico anódica como a corrente de pico catódica, sendo que antes da eletro-oxidação os picos são bem visíveis, e após a eletro-oxidação, ocorre uma diminuição significativa da corrente de pico catódico, indicando que houve oxidação da dopamina para formar a *orto*-quinona (TSE; McCREER; ADANS, 1976).

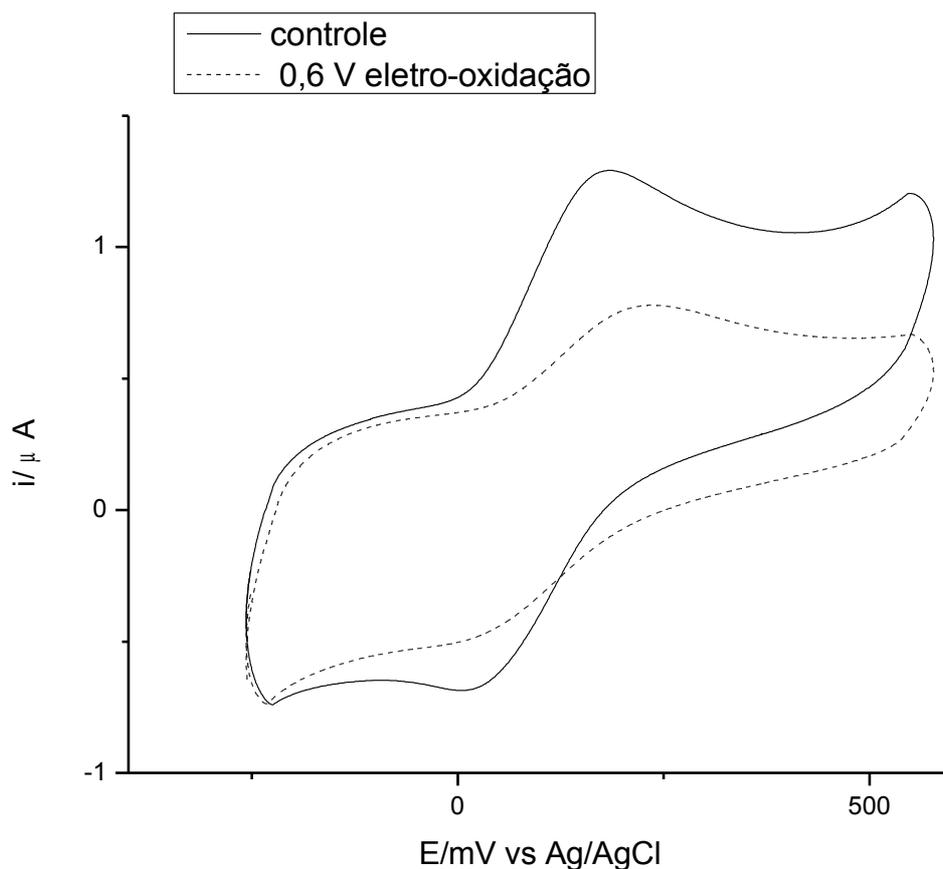


FIGURA 16- Voltamograma cíclico de dopamina antes e após a eletro-oxidação (0,6 V durante 20 minutos), num intervalo de potencial entre -0,3 e 0,6 V, com velocidade de varredura de 100 mV/s, em eletrodo de pasta de carbono.

A fim de certificar-nos da mudança dos sinais electrocatalíticos de DA pela oxidação do analito, foram realizados ensaios na presença do antioxidante L-ascorbato. A Figura 17 mostra os voltamogramas cíclicos da dopamina complexada somente com L-cisteína na presença de vitamina C e complexada com L-cisteína. Pode-se perceber o surgimento da corrente de pico catódica bem como o aumento da corrente do pico anódica na mistura de dopamina com ácido ascórbico e L-cisteína em relação à dopamina ligada a L-cisteína, sugerindo que a vitamina C interfere na complexação da dopamina com L-cisteína, impedindo a formação da dopamina-quinona e, conseqüentemente, a formação do complexo 5-S-Cys-dopamina (ZHANG, 2008).

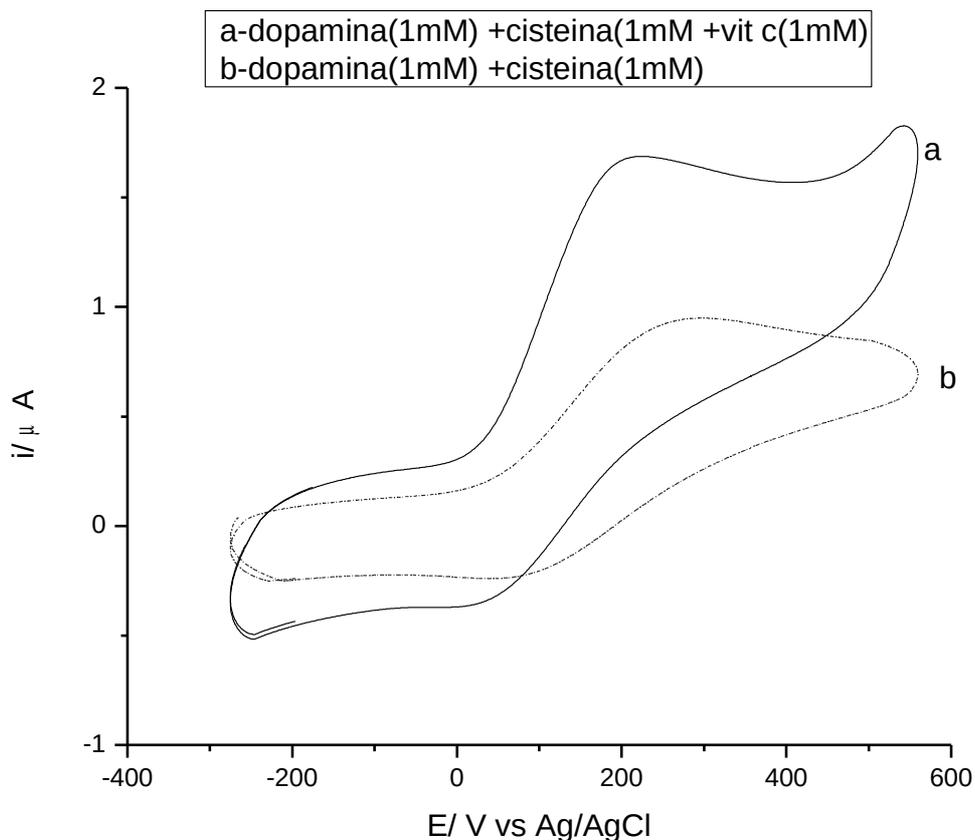


FIGURA 17- Voltamograma cíclico de 10^{-3} mol.L $^{-1}$ de dopamina, complexada com 10^{-3} mol.L $^{-1}$ de L-cisteína, (linha pontilhada) e 10^{-3} mol.L $^{-1}$ de dopamina na presença de 10^{-3} mol.L $^{-1}$ de ácido ascórbico e 10^{-3} mol.L $^{-1}$ de L-cisteína (linha contínua), entre -0,3 V e 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s.

5.3 Ciclovoltametria de BSA-dopaminocromo

5.3.1 Resultados das frações coletadas após eluição cromotográfica de BSA e dopamina

A fim de avaliar a resposta eletrocatalítica do complexo BSA-DA, alguns procedimentos de isolamento foram realizados, tais como equilíbrio de filtração em gel e diálise.

A análise das Figuras 18 e 19, sugere que a fração contendo solução de BSA é eluída nos primeiros tubos (2 e 3 mL), pois as moléculas maiores tendem a passar direto pela matriz resinosa, ao passo que a molécula de dopamina, por estar fora

do limite de corte da resina (5000 Da), tende a ser eluída nas últimas frações (6 e 7 mL). Dessa forma, podemos concluir que houve separação de BSA e dopamina que estava em excesso na solução (BOESE et al., 1995)

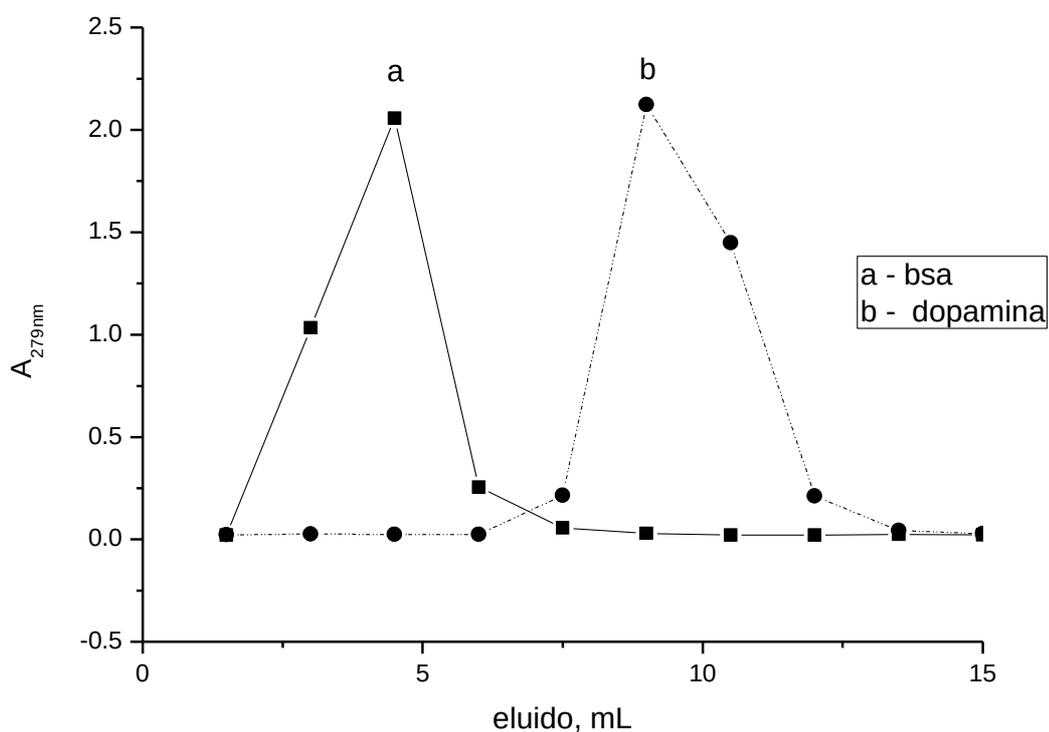


FIGURA 18- Resultados sobrepostos da absorvância das frações eluídas de BSA e dopamina sem pré-incubação, a partir dos ensaios.

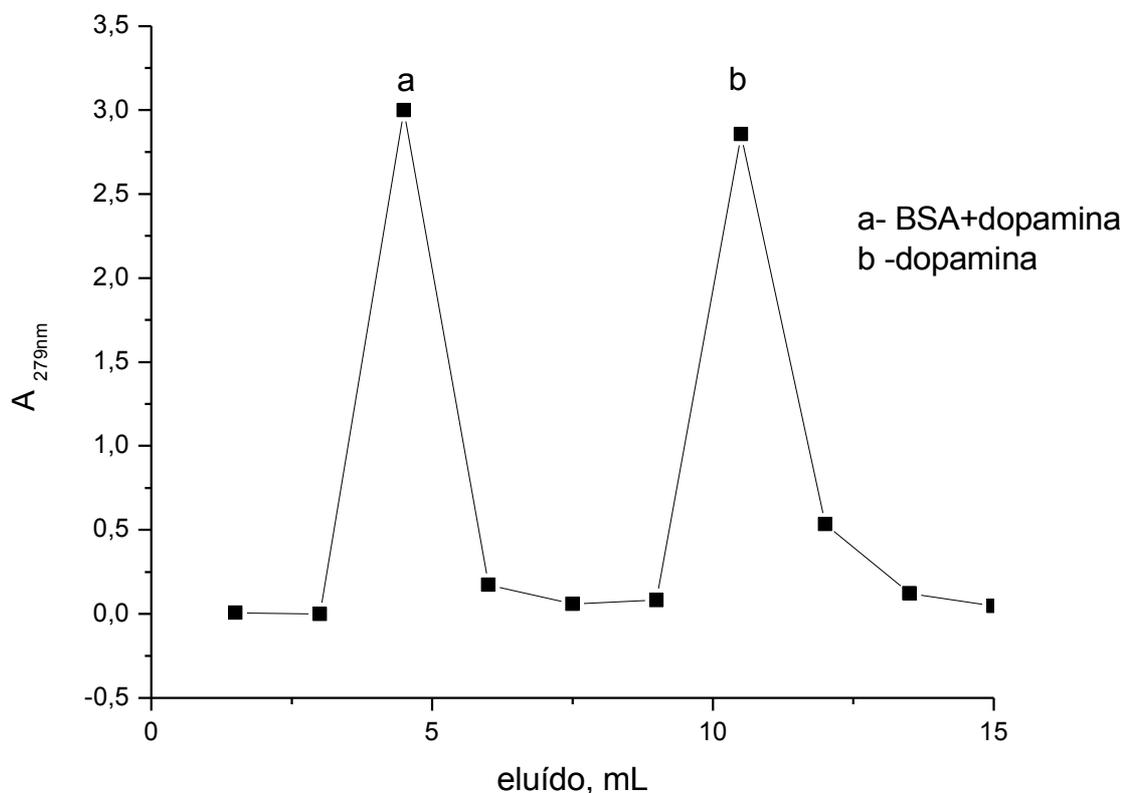


FIGURA 19 – Medidas da absorbância das frações coletadas da mistura BSA - dopamina após incubação.

Os resultados obtidos a partir dos dados eletroquímicos do complexo BSA-5-Cys-DA estão apresentados na Figura 20. BSA não apresentou uma alteração significativa de picos (Figura 20, curva a), mas quando marcada com DA, apresentou uma transferência intermolecular de elétrons revelada por um pico anódico com valor de E_{pa} próximo ao encontrado para DA livre (Figura 20, curva b e c). Como obtido para o complexo DA-5-S-Cys (Figura 17), o processo de oxidação não foi acompanhado por uma onda de redução significativa, sugerindo uma irreversibilidade para a reação, em oposição ao mecanismo quase-reversível apresentado pela oxidação de DA (Figura 11).

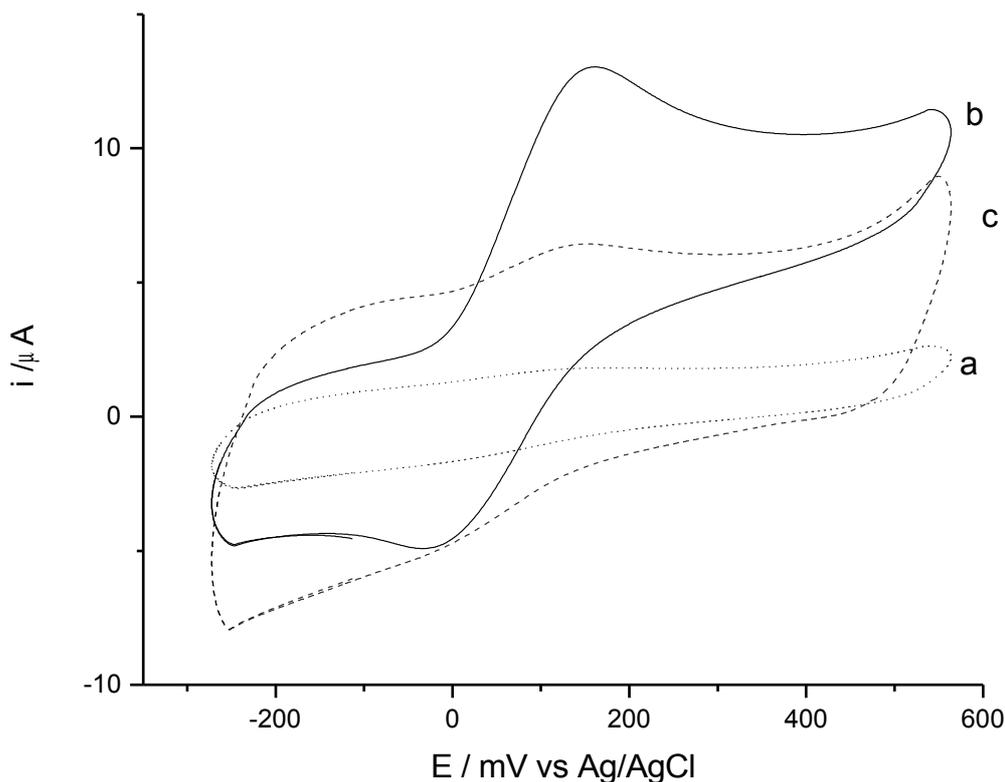


FIGURA 20- Voltamograma cíclico de: b-dopamina; c- dopamina complexada com BSA após diálise e b- e BSA em tampão fosfato pH de 7,4 numa velocidade de varredura de 100 mV/s.

A dopamina oxida-se reversivelmente de acordo com o mecanismo ECC (eletroquímico-químico-químico) a dopamina-orto-quinona. Em etapa posterior, a ciclização da dopamina-orto-quinona(1) pode ocorrer com a perda de um próton, gerando 5,5-dihidroxiindolina(2) e/ou a aminocromo(3), a qual pode sofrer polimerização e conseqüentemente bloquear a superfície do eletrodo. Como em meio neutro, a velocidade da reação é maior, a formação da 5,5-dihidroxiindolina é favorecida e conseqüentemente há o bloqueio da superfície do eletrodo (WEN; JIA; LIU, 1999). Na Figura 21, são representadas as etapas eletroquímicas citadas acima.

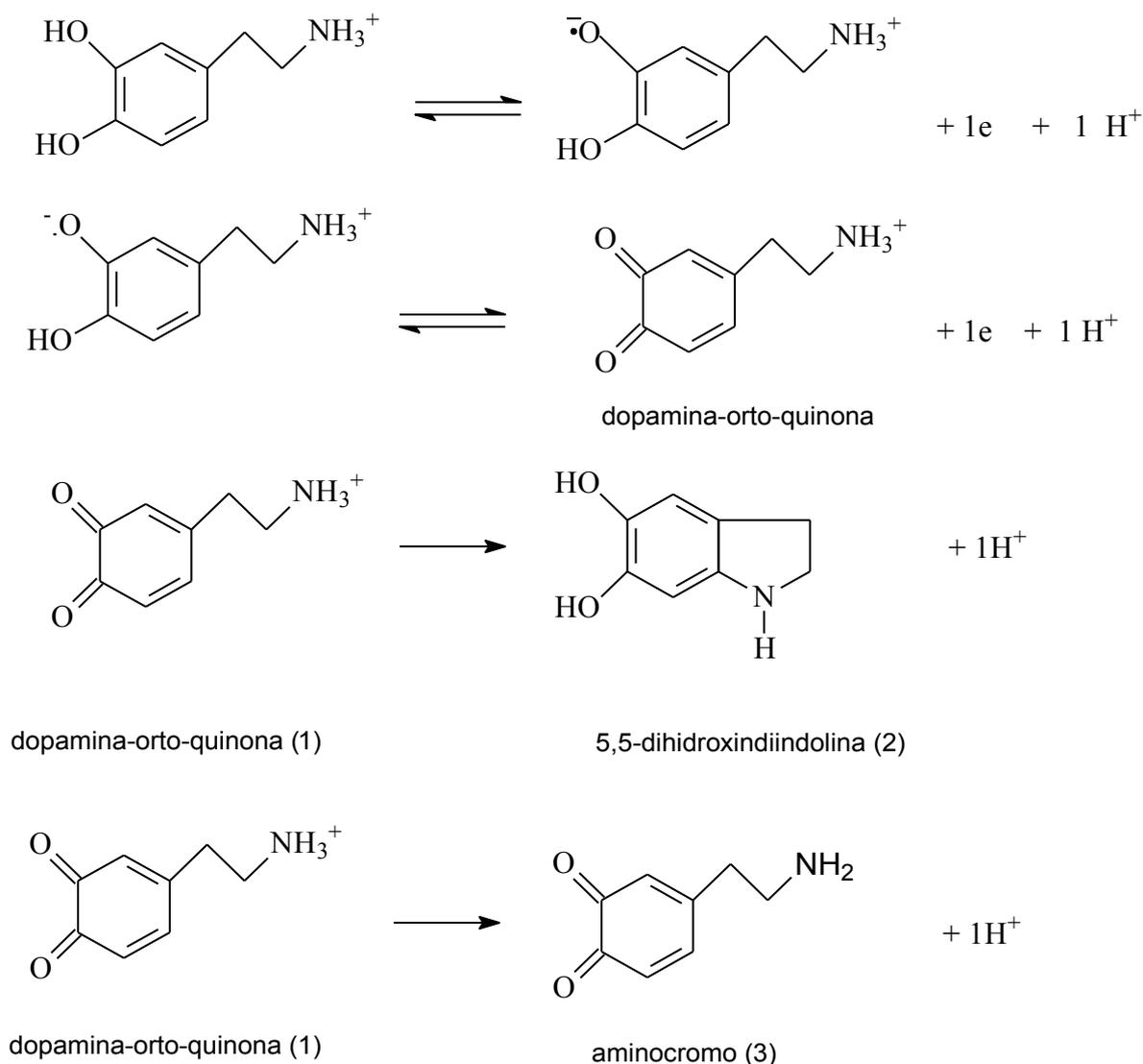


FIGURA 21 – Etapas da eletro-oxidação de dopamina
 Fonte: TOLEDO, 2006.

A fim de se obter dados sobre a cinética de transferência de elétrons entre o eletrodo e o complexo BSA-S-Cys-DA, alguns parâmetros dessa natureza foram determinados utilizando-se o tratamento de Laviron (WU; JI; HU, 2007). De acordo com esse tratamento, para um processo irreversível a constante de heterogeneidade padrão de transferência de elétrons, k^0 , e o coeficiente de transferência de carga, α , podem ser obtidos pela equação abaixo (SUN; JIAO; ZHAO, 2006).

$$E_p = E^0 + (2,303RT/\alpha nF) \log(RT k^0/\alpha nF) + (2,303RT/\alpha nF) \log v \quad (5)$$

, onde n representa o número de elétrons transferido, v a taxa de varredura e E^0 o potencial formal padrão. Dessa forma, o valor de αn pode ser calculado a partir da inclinação de um gráfico de $\log v$ por E_p , ou $\ln v$ por E_p (Figura 22), e o valor de k^0 , pelo intercepto, conhecido o valor de E^0 . Esse, por sua vez, pode ser obtido a partir do intercepto de um gráfico de v versus E_p , por extrapolação à diluição infinita no eixo da ordenada ($v=0$). Por esse tratamento foi encontrado um valor de k^0 de 1,47 e 1,16 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ para DA e BSA-S-Cys-DA, respectivamente, sugerindo uma diferença não significativa na taxa de transferência de elétrons entre DA livre e o aducto proteico de DA.

As reações mais complexas que envolvem rearranjo molecular significativo sobre a transferência de elétrons, tais como a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio ou água, ou a redução dos prótons a hidrogênio molecular, podem ser muito lentas. Valores de k^0 significativamente menores do que 10^{-7} cm/s sugerem processos irreversíveis (BARD, 2001).

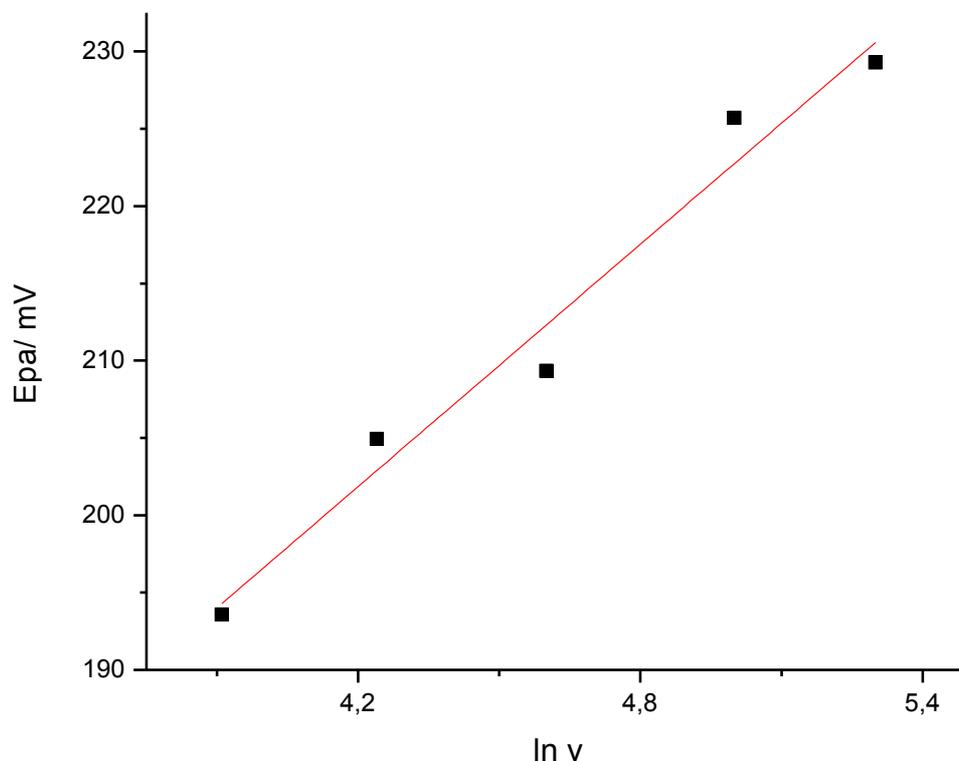


FIGURA 22 – Gráfico de $\ln v$ x E_{pa} de dopamina, como exemplo de representação para determinação de parâmetros cinéticos de transferência de carga ($R^2 = 0,964$).

Desde que uma contribuição de carga elevada de corrente é encontrada sobre razoáveis condições de demanda (baixas concentrações do analito, velocidade de varredura alta), distorções ôhmicas (perda iR), estão constantemente presentes (ZOSKI, 2007).

A queda ôhmica produz um grande aumento na determinação experimental da separação do potencial de pico ΔE_p . O efeito ôhmico torna E_{pc} mais negativo e E_{pa} mais positivo e ΔE_p com valores elevados (ZOSKI, 2007).

Para certificarmos de que a ligação de dopamina ocorreu no resíduo de Cys-34 livre da BSA, foi realizado um bloqueio do grupo tiol livre presente na mesma (Cys-34) com N-etilmaleimida (ROTMAN; DALY; CREVELING, 1976).

A Figura 23 mostra os voltamogramas cíclicos da dopamina com a BSA complexada com N-etilmaleimida, e da dopamina complexada com BSA depois de submetida à diálise. Foi observado que, com a dopamina complexada com N-etilmaleimida houve ma recuperação do sinal das correntes de pico anódica como da corrente de pico catódica, sugerindo que houve complexação entre a BSA e N-etilmaleimida, bloqueando o grupo tiol dessa última e impedindo que a ligação da dopamina com BSA (ROTMAN; DALY; CREVELING, 1976).

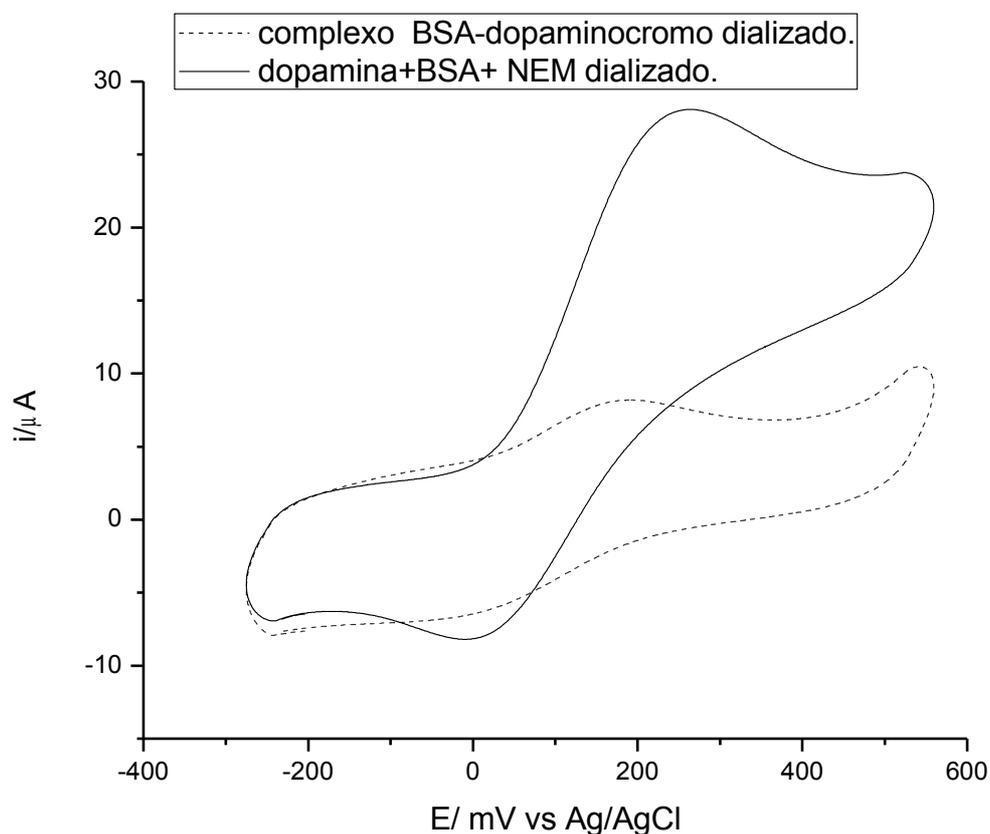


FIGURA 23 - Voltamogramas cíclicos da dopamina e de BSA complexada com N-etilmaleimida (linha contínua) e do complexo BSA-dopaminocromo (linha pontilhada), após diálise em um potencial entre -0,3 e 0,6 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s em pH de 7,4 num eletrodo de pasta de carbono.

O mecanismo de reação envolve formação de DA-quinona, após oxidação de DA (Figura 24), a primeira altamente reativa e

deficiente de elétrons, que sofre um ataque por nucleófilos, neste caso pelo grupo sulfidríla de cisteína livre. A interação da proteína com o reativo metabolito da DA, tem como resultado uma ligação covalente entre os grupos tíois com a DA-quinona para formar 5-cistenil-DA (LAAR et al.,2009).

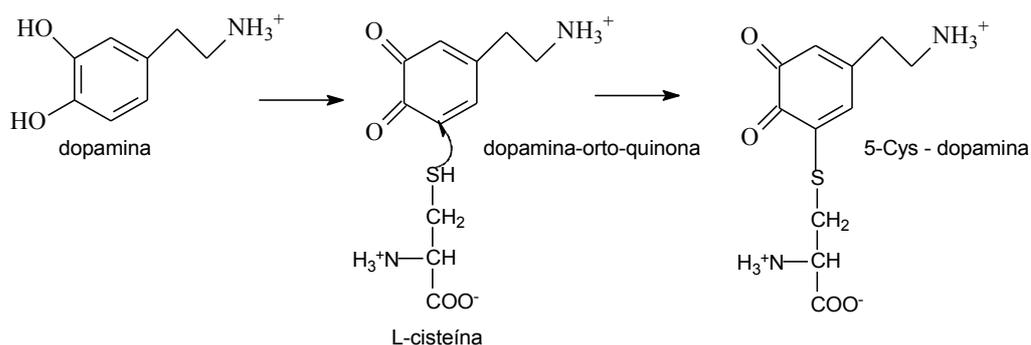


FIGURA 24 - Oxidação da dopamina em dopamina-quinona e o resultado da conjugação com L-cisteína (5-cys - DA).
Fonte: LAVOIE; HASTING, 1999.

A relação i_{pa}/i_{pc} para a dopamina livre e para a dopamina na presença do complexo BSA-NEM mostrou-se similar, sugerindo a forma livre do analito na resposta eletroquímica para ambos, embora outros parâmetros eletroanalíticos calculados tenham sido distintos.

Esses dois valores, juntamente com o valor reduzido de α para dopamina-BSA-NEM, podem relacionar-se à provável cobertura parcial do complexo BSA-NEM sobre a superfície eletródica, devido à rede de carga líquida em torno de -17 para a proteína no pH ensaiado (BOHME; SCHELER, 2007). Assim, sob um pico de oxidação positivo em torno de 200 mV, o complexo desprovido de dopamina (BSA-NEM) pode ter sofrido atração eletrostática do seio da solução para a superfície eletródica. Essa adsorção parcial poderia, por sua vez, limitar o acesso da dopamina à transferência de elétrons, mas sem alteração na relação da corrente de oxi-redução produzida, para o analito que tenha atingido a superfície livre do eletrodo.

Nesse sentido, o potencial de pico anódico para o sistema (BSA-dopaminocromo) teve a relação i_{pa}/i_{pc} reduzida próximo à metade de seu valor original (dopamina livre), revelando uma menor capacidade oxidativa para o complexo BSA-dopaminocromo em relação à forma livre de dopamina. Esse dado pode ser contrastado com a região hidrofóbica intrínseca do ambiente do resíduo de Cys-34 de interação com a catecolamina (STEWART et al., 2004), o que pode refletir um aumento na distância física de contato dos grupamentos químicos envolvidos no mecanismo de oxi-redução do complexo, em relação à dopamina livre.

5.4 Estabilidade do complexo BSA-Dopaminocromo

Medidas de corrente sob potencial de pico anódico para o complexo foram tomadas ao longo de uma semana com várias amostras, a fim de validar preliminarmente a estabilidade de sinal eletroquímico dos complexos. A Figura 25 apresenta o resultado comum de uma dessas amostras, sugerindo uma oxidação relativamente moderada do complexo sob acondicionamento (48 h sob 5 °C).

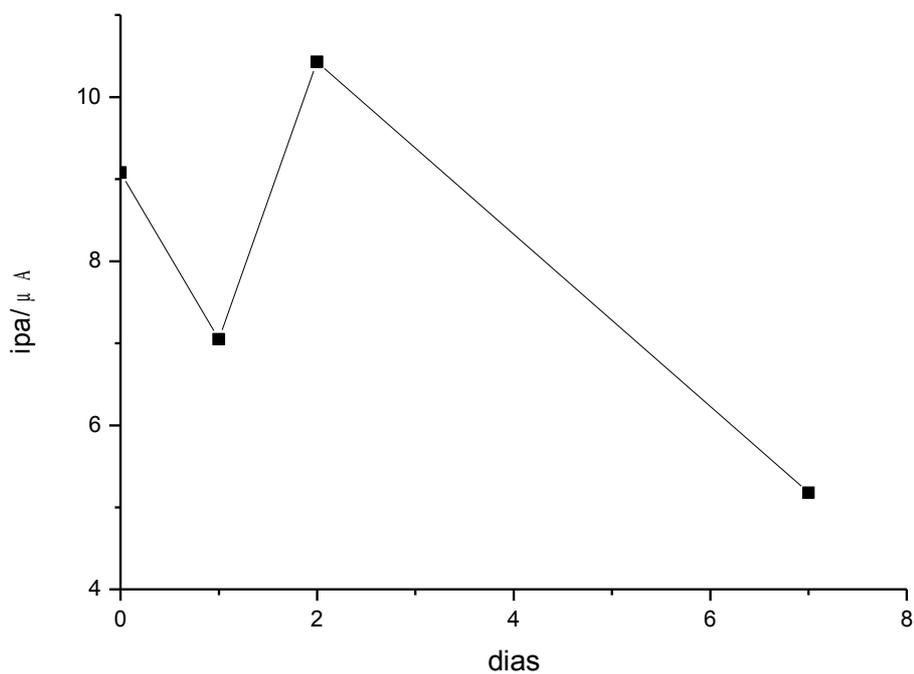


FIGURA 25- Gráfico de ipa do complexo BSA-dopaminocromo em função do tempo (dias).

Ciclovoltamogramas foram obtidos para o complexo sob condições tamponadas a distintos valores de pH (Figura 26)

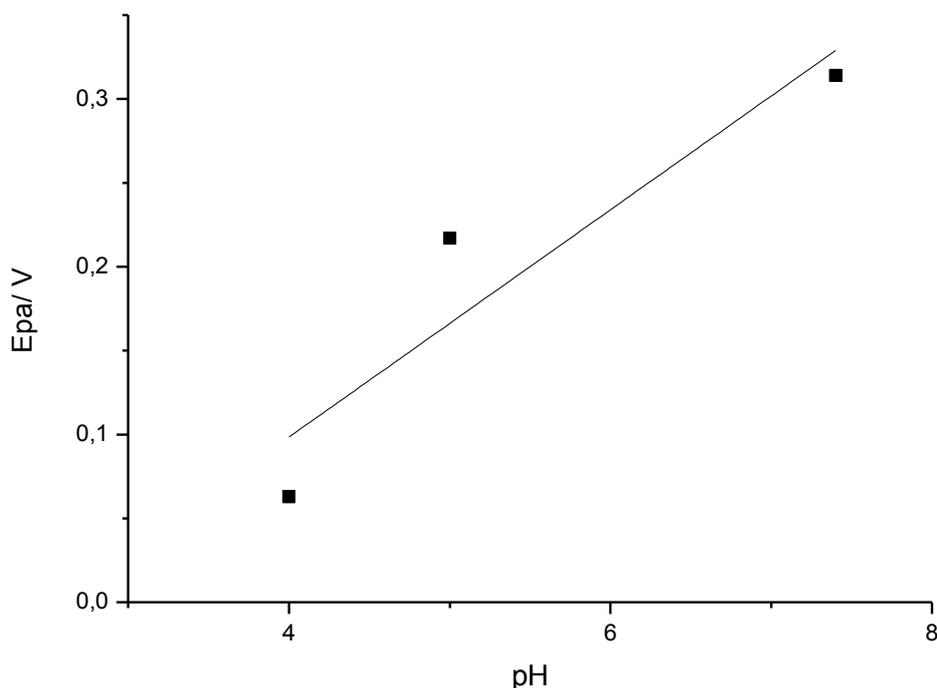


FIGURA 26 – Gráfico de Epa do complexo BSA-dopaminocromo em função do pH.

O valor da inclinação obtida, $0,067 \text{ V/pH}$, foi próximo de $0,059 \text{ V/pH}$, sugerindo que o número de elétrons transferidos foi igual ao número de prótons que participam da reação de oxidação (BATTISTUZZ, G. et al., 1997).

A Figura 27 apresenta os valores de corrente em função da variação de pH obtido, onde os ensaios puderam identificar um aumento da corrente de pico anódica obtido. Correntes de pico anódico não puderam ser obtidas em faixas de grande acidez (pH 3,0) nem de alcalinidade alta (pH 9,0). Assim os dados da Figura 27 sugerem que o ambiente fisiológico é mais propício para a transferência de carga entre o complexo e a superfície eletródica, corroborando com o papel da soroalbumina na remoção de derivados metabólicos de neurotransmissores.

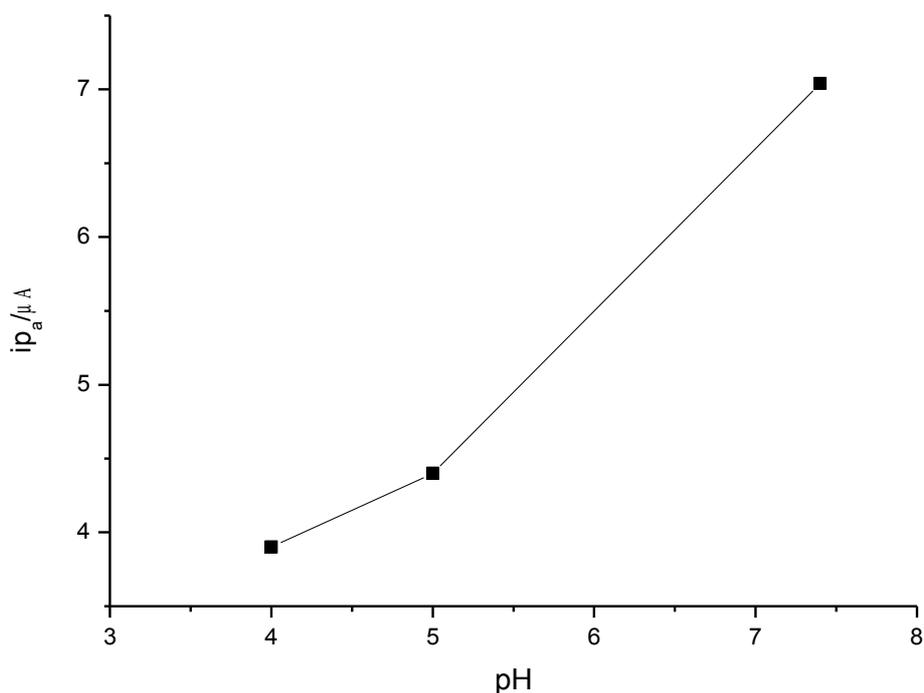


FIGURA 27– Gráfico de i_{p_a} do complexo BSA-dopaminocromo em função do pH.

Ensaio de CV também foram efetuados com intervalos de varredura de potencial em valores mais expressivos que os apresentados à Figura 13, no intuito de se observar mudanças no mecanismo de transferência de carga coadunadas às alterações vistas sob variação experimental de pH.

5.5 Espectrofotometria.

Ensaio realizados com taxas de varredura de 10 a 5000 mV/s apresentaram um perfil curvilínea acima de 100 V/s (Figura 28), sugerindo uma mudança no mecanismo de transferência de elétrons acoplada às reações de oxidação da DA. Não obstante, o deslocamento do potencial de oxidação formal para valores mais baixos sugere uma estabilização do complexo com a forma oxidada do ligante (BATTISTUZZ et al., 1997).

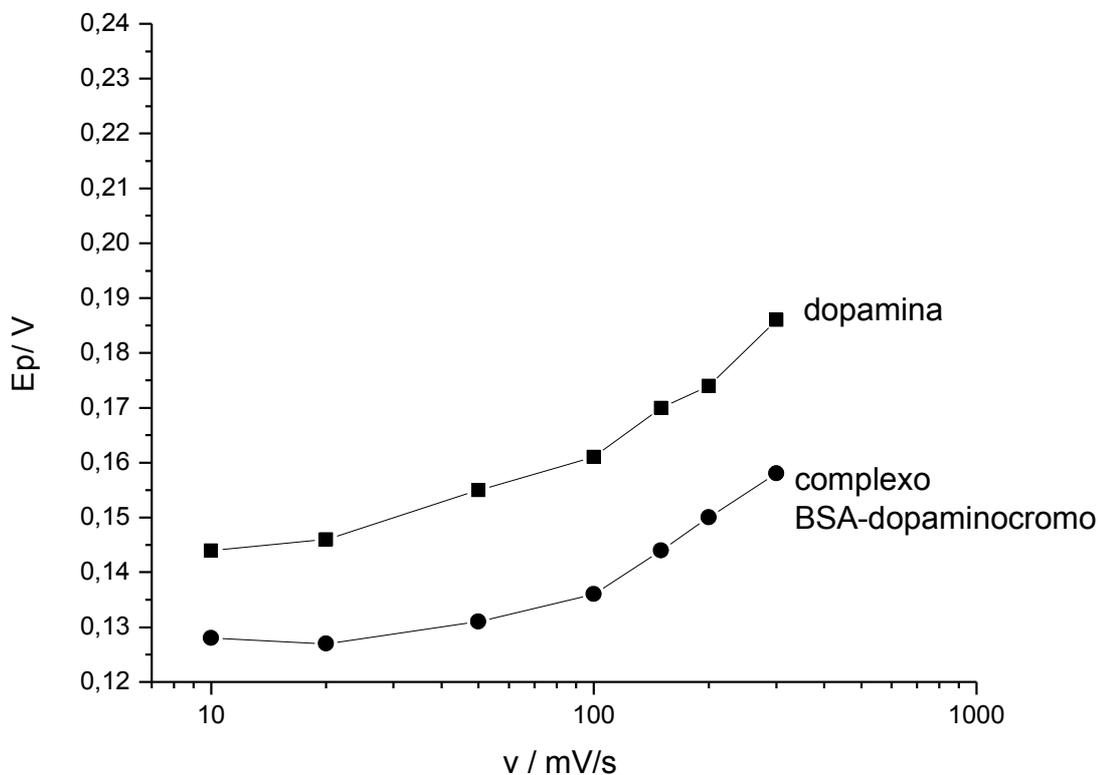


FIGURA 28– Medidas de potencial de pico anódico para o complexo em função da velocidade de varredura entre $5\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e $500\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.5.1 Espectrofotometria de primeira derivada do complexo BSA-S-Cys-DA

O espectro de absorção de BSA não possui sinal na faixa de comprimento de onda da luz visível. O espectro de DA, contudo, exibe um pequeno valor para densidade óptica devido às reações de oxidação e intraciclização da molécula (KLEGERIS; KORKINA; GREENFIELD, 1995)

Nesse sentido, a espectrofotometria de primeira derivada pode revelar detalhes do espectro original e contribuir para a redução do ruído espectral apresentado por esse último (WIGGINS et al, 2007). A Figura 29 (painel B) apresenta os dados espectrofotométricos encontrados para DA e BSA-S-Cys-DA, onde pode se observar um pico negativo de absorbância para o espectro de primeira derivada do complexo em 370 nm, quando comparado

às alterações de menor valor apresentadas no espectro de DA (432 nm), devido à sua oxidação. Esse resultado corrobora com os dados eletroquímicos encontrados para BSA-S-Cys-DA, e revela outra propriedade espectroscópica para o complexo, que pode ser utilizada em estudos espectrofotométricos de proteínas na região do visível, algo inexistente para proteínas sem grupos prostéticos.

5.5.2 Espectrofluorimetria da BSA-5-Cys-dopamina

Paralelamente ao seu comportamento eletroquímico, DA apresenta um espectro fluorimétrico entre 300 e 350 nm (WANG; SUN; TANG, 2002). Assim, foi estudado o comportamento espectrofluorimétrico de DA complexada com BSA. Os dados obtidos entre 300 e 500 nm de emissão são apresentados na Figura 29 A. DA apresentou um pico de emissão máximo em 320 nm quando excitada em 279 nm, ao passo que BSA apresentou um pico máximo em 348 nm (emissão). Após a ligação covalente de DA à proteína, ocorreu um deslocamento batocrômico para BSA com sinal espectrofluorimétrico hiperacrômico em relação à proteína livre. Essa mudança no pico máximo em relação à proteína livre pode ser explicada pela alteração no ambiente da quinona oxidada em sua ligação com BSA, quando comparada a DA livre.

Isto sugere que as moléculas de DA foram efetivamente complexadas às moléculas de BSA. Ensaio de desnaturação de BSA-S-Cys-DA com 6 mol.L⁻¹ de uréia incubada em solução durante 5 h também apresentaram um aumento significativo do pico de fluorescência, esse de valor mais elevado que o obtido com BSA livre desnaturada. Esse resultado reduz a probabilidade do efeito hiperacrômico apresentado ser devido à desnaturação induzida pela ligação covalente a DA.

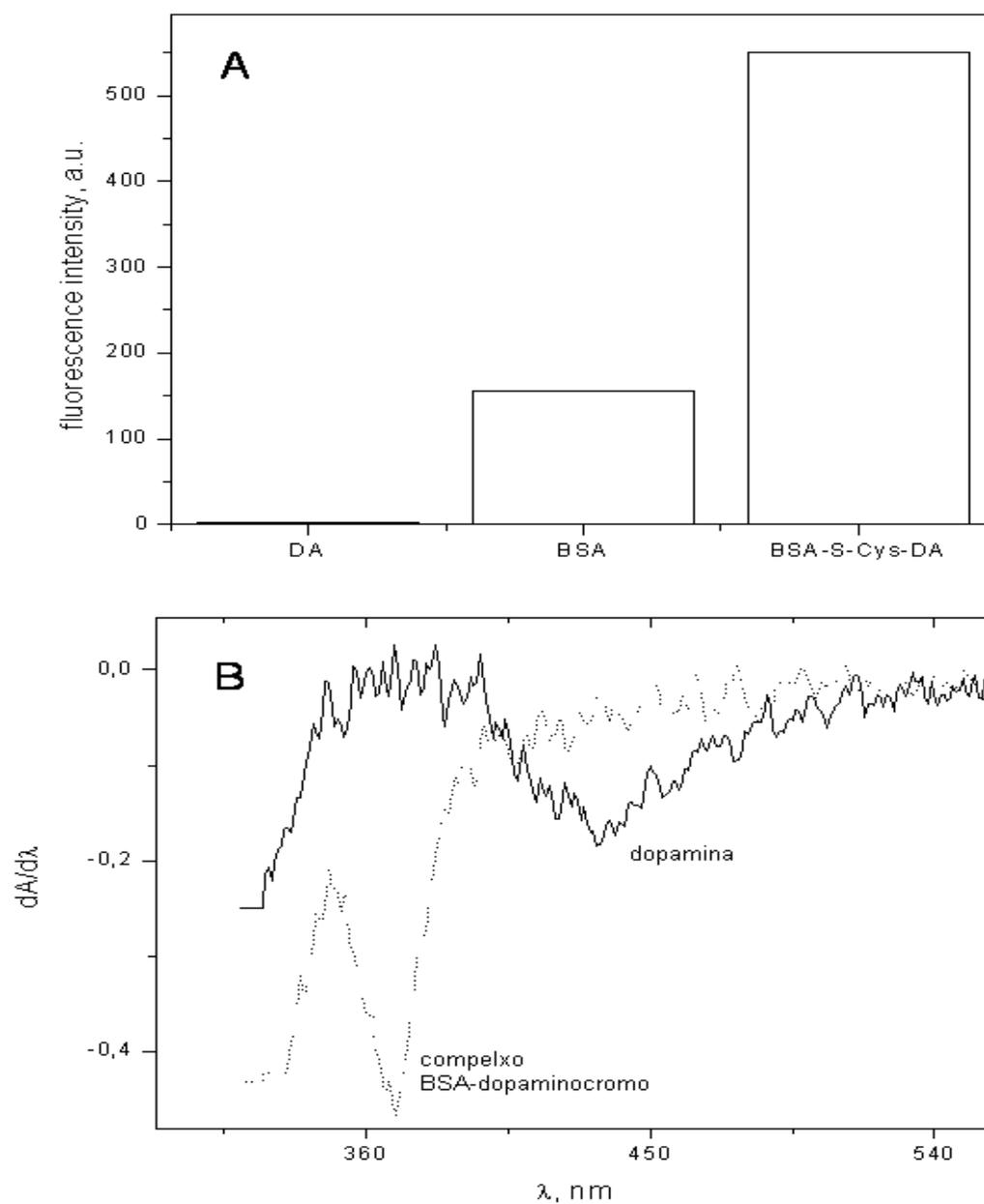


FIGURA 29- Espectrofluorimetria (A) e espectrofotometria de primeira derivada(B) do complexo de dopamina com BSA.

6 CONCLUSÕES

- A dopamina foi identificada por voltametria cíclica em eletrodo de pasta de carbono não modificada.
- Os parâmetros eletrocatalíticos da dopamina foram determinados como $E_{pa} = 214 \text{ mV}$ e $k^0 = 1,47 \text{ cm/s}$.
- O complexo BSA-dopaminocromo foi formado em reação simples de mistura de dopamina com DA, e sob condições fisiológicas.
- A BSA complexada com dopamina não exibiu grupo tiol livre.
- O complexo BSA-dopaminocromo foi identificado em eletrodo de pasta de carbono simples,
- O valor de k^0 para o complexo BSA-dopaminocromo foi de $1,16 \text{ cm/s}$.
- O complexo BSA-dopaminocromo apresentou-se relativamente estável e com sinais eletroquímicos otimizados em pH fisiológico.
- O complexo BSA-dopaminocromo apresentou propriedades duais eletroquímicas e espectroscópicas (absorção e emissão), com potencial utilização em estudos de proteínas.
- O complexo BSA-dopaminocromo apresentou valores espectrofluorimétricos máximos de emissão superiores aos apresentados por DA ou BSA livres.
- O complexo BSA-dopaminocromo apresentou propriedades de absorção espectroscópicas não encontradas para proteínas desprovidas de grupos prostéticos.
- A formação do complexo BSA-dopaminocromo e a consequente identificação da macromolécula em solução por voltametria cíclica sugere um método novo e simples para etiquetagem eletroquímica de proteínas e em especial, aquelas desprovidas de grupos prostéticos.

REFERÊNCIAS

ALFARO, I. M. et al. The role of catecholamines as mediators in the glucose oxidase/glucose system. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, n. 38, p. 307-313, 1995

AKAGAWA, M. et al. Catalyzed oxidation of protein-bound dopamine. **Biochemistry**, v. 45, n.50, p. 15120-15128, 2009.

ARAÚJO, R. F. F. **Aplicação de polímeros como matrizes no desenvolvimento de biossensores e na purificação de proteínas**, 2006, 186 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

ARDAKANI, M. M. et al. Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode. **Bioelectrochemistry**, n.75, p.1–8, 2009.

ARMSTRONG, F. A. Voltammetry of proteins. **Encyclopedia of electrochemistry**, v. 9, 2001.

ARMSTRONG, F. A, WILSON, G. S. Recent development in faradaic bioelectrochemistry. **Electrochim Acta**, n. 45, p. 2623–2645, 2000.

AVENDAÑO, S. C. et al. On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution. Part I: The role of [SDS] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 609, p.17–26, 2007.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods fundamentals and applications**. New Jersey : John Wiley , 2001.

BATTISTUZZ, G. et al. Redox thermodynamics, acid-base equilibria and salt-induced effects for the cucumber basic protein. General implications for blue-copper proteins. **J. Bic.**, n. 2, p.350-359, 1997

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P.; DEEBLE, D. J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. **Free Radical Biol. Med.**, n.13, p. 391-405, 1992.

BOESE, M. et al. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. **The journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 47, p. 29244-29249, 1995.

BOHME, U.; SCHELER, U. Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR. **Chemical Physics Letters**, n. 435, p. 342–345, 2006.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra : Almedia, 1996.

CARLSON, A.; ROOKE, A. Stabilized albumin preparation. **US Patent**, n. 7351800-B2, 2008.

CALBREATH, D. F. **Clinical chemistry: a fundamental textbook**. Philadelphia : W. B. Saunders, 1992. cap.16, p.339.

CHIKU, M. et al. Direct electrochemical oxidation of proteins at conductive Diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry** , n. 612 ,p. 201–207, 2008.

COSTA, J. A. C. da; MOYSÉS NETO, M.; VIEIRA NETO, O. M. Insuficiência renal aguda na terapia intensiva, Ribeirão Preto, Simpósio: **Medicina intensiva**: ii. Tópicos selecionados capítulo iv, n. 31, p. 532-551, 1998.

DONATO, M. D; CORREA, A; PELUSO, A. The role of iron-histidine bridge in the early steps of photosynthesis, **Chemical Physics Letters**, v. 369, p. 549-555, 2003.

GRAHAM, D. G. et al. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro, **Mol. Pharmacol.**, n. 14, p. 644-653, 1978.

GUTTERRES, M. V.; VOLPE, P. O. L.; FERREIRA, M. M. C. Multiway Calibration for creatinine determination in Human Serum using the Jaffé Reaction. **Applied Spectroscopy**, v. 58, p. 54-60, 2004.

HELI, H. et al. Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface – Applied to albumin-modified electrode: Mode of protein–ligand interactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 610, p. 67–74, 2007.

KISSINGER, P. T. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

KLEGERIS, A.; KORKINA, L. G.; GREENFIELD, S. A. Autoxidation of dopamine: A comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. **Free Radical Biology & Medicine**, n.18, p. 215-222, 1995.

LAAR, S. V. et al. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. **Neurobiology of Disease**, n. 34, p 487–500, 2009.

LAVOIE, M. J.; HASTINGS, T. G. Dopamine quinone formation and Protein Modification Associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. **The Journal of Neuroscience**, n.14, p.1484-1491, 1999.

LOJOU, E; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, n.1, p. 79–91, 2006.

LU, L. et al. Microdetermination of human serum albumin by differential pulse voltammetry at a L-cysteine modified silver electrode, **J. Chem. Sci.**, v. 120, n. 4, p. 419–424, 2008.

MATTHEW, F. et al. Electrochemical detection and characterization of proteins. **Biosensors and Bioelectronics**, n . 22, p. 670–677, 2006.

MOSCA, L. et al. 5-S-Cysteinyl-dopamine effect on the human dopaminergic neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Neurochemistry International**, n. 29, p. 262-269, 2006.

MOULTON, S. E. et al. Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode. **Journal of colloid and interface science**, n. 261, p.312-319, 2003.

NAKAMURA, Y. et al. Pivotal role of electrophilicity in glutathione s-transferase induction by tertbutylhydroquinone. **Biochemistry**, n. 42, p. 4300-4309, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo : Guanabara Koogan, 2006.

PALUMBO, A. et al. Iron- and peroxide-dependent conjugation of dopamine with cysteine: oxidative routes to the novel brain metabolite 5-S-cysteinyl dopamine. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1245, p. 255-261, 1995.

PATTISON, D. I. et al. Oxidation of DNA, proteins and lipids by dopa, protein-bound dopa, and related catecholamines, **Toxicology**, n. 177, p. 23-37, 2002.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.
Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

QIAL, Y. et al. Composite films of lecithin and heme proteins with electrochemical and electrocatalytic activities. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 315, p. 537–543, 2007.

PROSHLYAKOV, D. A. et al. Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244. **Science**, n. 290, p. 1588-1591, 2000.

ROTMAN, A.; DALY, J. W.; CREVELING, C. R. Oxygen-dependent reaction of 6-Hydroxydopamine, 5, 6-dihydroxytryptamine, and related compounds with proteins *in vitro*: a model for cytotoxicity. **Molecular Pharmacology**, v. 12, p. 887-899, 1976.

SANTOS, S. X. **Aplicação de eletrodos compósitos à base de borracha de silicone na determinação de substâncias de interesse farmacológico**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em ciências)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SHEN, X. M.; DRYHURST, G. Further Insights into the Influence of L-Cysteine on the Oxidation Chemistry of Dopamine: Reaction Pathways

of Potential Relevance to Parkinson 's Disease. **Chem. Res. Toxicol.**, n. 9, p. 751-763, 1996.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M. E.; HOLLER, J. F. **Fundamentos da química analítica**, 8. ed. São Paulo: Pioneira, 2006.

STEWART, A. J. et al. Role of Tyr 84 in controlling the reactivity of Cys 34 of human albumin. **FEBS Journal**, n. 272, p. 353–362, 2005.

SUN, D.; MA, W.; ZHANG, Z. Cyclic voltammetric determination of dopamine in drug using poly (L-lysine) modified electrode. **Chinese. J. Anal. Chem.**, v. 34, p. 668-673, 2006.

SUN, Y.; YE, B.; ZHANG, W.; ZHOU, X. Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at poly (neutral red) modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 363, p. 75-80, 1998.

SUN, W.; JIAO, K. Linear sweep voltammetric determination of protein based on its interaction with Alizarin Red S. **Talanta** , v. 56, p.1073–1080, 2002.

SUN, W.; HAN, J.; ZHAO, C. A linear sweep voltammetric determination of proteins with Thorin. **Acta Chim. Slov.**, n. 53, p. 367-373, 2006.

TOLEDO, R. A. **Estudo eletroquímico e desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de antidepressivos tricíclicos e neurotransmissores**. 2006.107 f. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

TSE, D. C. S.; McCREERY, R. L.; ADANS, R. N. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.19, n. 1, p. 37-40, 1976.

VAN HOLDE, K. E. **Bioquímica física**. São Paulo : Edgard Blücher, 1975.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3.ed. New Jersey : John Wiley, 2006.

WANG, J. et al. Studies of interaction between iron (III) and intermediates of synthetic neuromelanin by means of cyclic voltammetry of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ and dopamine. **Journal of electroanalytical Chemistry**, v. 594, p. 59–64, 2006.

WEN, X. L; JIA, Y. H; LIU, Z. L. Micellar effects on electrochemistry of dopamine and its selective detection in presence of ascorbic acid. **Talanta**, v. 50, p.1027-1033, 1999.

WIGGINS. et al. An investigation into the use of calculating the first derivative of absorbance spectra as a tool for forensic fibre analysis. **Science and Justice**, n. 47, p. 9 –18, 2007.

WINTER, E. et al. Electrochemical behavior of dopamine in the presence of citrate: Reaction mechanism. **Electrochimica Acta**, n. 51, p. 1282–1288, 2006.

WU, Y.; JI, X.; HU, S. Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin. **Bioelectrochemistry**, n. 64, p. 91– 97, 2004.

YAMASAKI, M.; YANA, H.; AOKI, K. DSC studies on BSA: effects of pH and ionic strength. **Int. J. Biol. Macromolec.**, n. 12, p. 263-268, 1990.

ZHANG, L. Covalent modification of glassy carbon electrode with cysteine for the determination of dopamine in presence of ascorbic acid. **Microchimica Acta**, n. 161, p. 191-200, 2008.

ZHANG, X. et al. Immobilization and electrochemistry of cytochrome c on amino-functionalized mesoporous silica thin films. **Electrochemistry Communications**, n. 9, p. 2098–2104, 2007.

ZHANG, Y. Z. et al. Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly (acridine red) modified glassy carbon electrode. **Sensors**, v. 3, n. 10, p. 443-450, 2003.

ZHAO, H.; ZHANG, Y.; YUAN, Z. Study on the electrochemical behavior of dopamine with poly (sulfosalicylic acid) modified glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 441, p. 117-122, 2001.

ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. Las Cruces : Elsevier, 2007.

APÊNDICE A – Resumo do artigo submetido

Cross-linking of dopamine with albumin as an electrochemical labeling for studying proteins without metallic redox centers.

Abstract.

A very simple strategy for studying electrochemical properties for any protein was developed by cross-linking dopamine with BSA. The results were evaluated by cyclic voltammetry, spectrofluorimetry and first-derivative spectrophotometry in the visible range. Unmodified carbon paste electrodes were used for identify the BSA-5-Cys-DA complexes in solution. This approach allowed to overlap the sluggish kinetics of electron transfer exhibited by proteins with non-mettalic redox centers near the surface electrode. Furthermore a marked increased in fluorecence signal at 350 nm emission together with the appearance of a BSA absorption signal at 370 nm aroused from the protein adducts. In this sense the covalent linkage between a test protein with dopamine show it as a dual candidate able to display both electrochemical and spectroscopic signals, and allow the use of this approach for identify and analyze proteins either in solution or immobilized.

Revista



Chemical and Biochemical Engineering Quartely

Manuscrito submetido em 16/12/2009.

APÊNDICE B

As páginas que seguem descrevem um conjunto de experimentos realizados no Lab. Bioquímica da Unifal-MG, com o intuito de se validar uma metodologia para medidas de respostas eletroquímicas em proteínas em solução ou imobilizadas, modificadas ou não com mediadores de transferências de carga. Esses ensaios preliminares precederam a proposta final da dissertação em análise, estando relacionados a objetivo anterior, pontuado pela medida de quantidades termodinâmicas em proteínas, obtidas em experimentos de voltametria cíclica com varredura termal contínua.

1 Estudo de proteínas imobilizadas

1.1 Imobilização através de ligação covalente

1.1.1 Determinação da albumina de soro bovino em eletrodo de ouro modificado com L-cisteína em solução tampão acetato pH de 4,7.

Foi preparado um eletrodo de Au através do lixamento e polimento do mesmo até imagem especular da superfície metálica. Em seguida foi realizada uma varredura entre +1,5 V e -0,2 V em uma solução de ácido sulfúrico 0,2 mol. L⁻¹. Após essa limpeza, foi feita uma varredura empregando solução de BSA (1mg/mL) entre -0,2 e +0,4 V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s até a estabilização da linha de base. Em seguida, o eletrodo foi imerso em uma solução 0,1 mol. L⁻¹ de L-cisteína por 10 h e deixado secar por 1 h à temperatura ambiente. Após a modificação do eletrodo, foi realizada uma pré-concentração em etapa única com um potencial fixo de 100 mV por 15 minutos, utilizando com 200 µL da solução de BSA. Por fim, foi realizada uma varredura com tampão acetato de sódio pH de 4,7 na ausência e presença de BSA (1 mg/mL) com um potencial entre -0,8 e 0,2 V numa velocidade de varredura de 100 mV/s.

1.1.2 Determinação de BSA em eletrodo de pasta de carbono imobilizada por meio de ligação covalente com dopamina

1.1.2.1 Preparo da coluna cromatográfica

Foi aquecida sob agitação constante 10 g de resina G-25, sem deixar entrar em ebulição, durante 10 minutos, deixada a decantar durante 10 min, e em seguida a solução sobrenadante foi trocada por água destilada, reaquecida, homogeneizada e deixada a decantar. Esse procedimento foi repetido 3 vezes (lavagens). A coluna foi empacotada em uma pipeta de vidro de 16 cm tomando-se o cuidado para não se formar bolhas de ar. Utilizando lã-de-vidro na extremidade da pipeta, para impedir o escoamento da resina. Após o empacotamento, foi adicionado um papel de filtro sobre a resina. Por fim, foi montado um sistema de eluição com funil de separação contendo a solução tampão. Inicialmente, foi realizada uma corrida com 300 mL de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ na coluna, sendo a mesma equilibrada com 50 mL de tampão fosfato.

Foram realizadas duas eluições, a primeira delas usando 500 µL de BSA (5 mg/mL) e sendo analisados os 12 primeiros tubos no espectrofotômetro em cubetas de quartzo em 279 nm. Já a segunda corrida, foi feita após a coluna ser equilibrada com 30 mL de tampão, utilizando 500 µL de solução de dopamina (1 mg/mL). Também nessa corrida foi realizada análise dos 12 primeiros tubos. A coluna foi re-equilibrada com 30 mL de tampão fosfato e, por fim, foi realizada uma corrida com 500 µL de uma mistura de BSA com dopamina 1:1(v/v), e feita a análise dos 12 primeiros tubos, seguindo-se análise em planilha eletrônica (Origin, OriginLab, versão 8.0, USA).

1.1.3 Determinação do citocromo c imobilizado em L-cisteína utilizando glutaraldeído como promotor

Um eletrodo de pasta de carbono foi imerso em uma solução 0,5 M de cisteína durante 30 minutos, em seguida o mesmo eletrodo foi imerso em glutaraldeído 10% (m/v) durante 20 minutos e lavado com 2 μ L de cit c. Finalmente, foi deixado secar com ponteira plástica ajustada em sua superfície durante 15 h em geladeira 4°C.

Outro eletrodo foi imerso em uma solução 0,5 M de cisteína durante 15 h em geladeira a 4 °C; em seguida foi imerso em uma solução a 10%(m/v) de glutaraldeído durante 60 minutos. Por fim, foram adicionados 2 μ L de cit c e deixado a secar em ambiente refrigerado. Procedeu-se então a voltametria cíclica realizada a um potencial entre +0,6 e -0,6 V, com uma velocidade de 100 mV/s, após ter sido realizada a corrida em tampão PBS pH 7,2.

1.1.4 Determinação da hemoglobina (Hb) imobilizada em eletrodo de pasta de carbono com lecitina

Foram preparados 1,0 mL de solução de lecitina (5mg/mL), em etanol. Foram pipetados 30 μ L de solução concentrada de Hb (1mg/mL) e 30 μ L de solução de lecitina colocados em um tubo pequeno (1,5 mL). Este tudo foi lacrado e sonicado por 15 minutos. Em seguida, pipetou-se 10 μ L da suspensão de Hb-lecitina e adicionou-se com cuidado sobre a superfície do eletrodo de pasta de carbono, ajustado uma ponteira de pipeta sobre a superfície. O eletrodo foi seco por 18 h em temperatura ambiente, lavado cuidadosamente com água destilada para retirar o excesso da suspensão, seguindo-se uma corrida no potenciostato com um potencial entre a -0,9 e +0,3 V, a uma velocidade de varredura de 100 mV/s.

1.1.5 Determinação da Hb e do citocromo c imobilizados em eletrodos de Au por meio de membrana de diálise

Adicionou 2 μL de solução de cit c e Hb na superfície do eletrodos de Au, deixou-o secar a temperatura ambiente, em seguida a ponta do eletrodo foi selada com uma membrana de diálise. Foi realizado uma corrida no potenciostato com um potencial entre +0,6 e -0,6 V a uma velocidade de varredura de 100 mV/s.

1.1.6 Determinação de BSA através da imobilização em eletrodos compósitos à base de grafite e borracha silicone

Os eletrodos foram preparados misturando 70 mg de grafite em pó com 10 μL de BSA (5 mg/L) e 20 mg de borracha de silicone. A mistura foi homogeneizada por 10 minutos em almofariz de vidro, e inserida em tubos de vidro (diâmetro de 3,0 mm). Uma vez inserido no tubo de vidro, o composto foi comprimido com auxílio de uma barra de cobre. Em seguida, o contato elétrico foi estabelecido conectando um fio de cobre ao compósito com auxílio de cola super-bond comercial. Foram preparados dois eletrodos; um com BSA e outro eletrodo com tampão (controle) no lugar de BSA. A superfície do compósito foi exposta por abrasão em lixa d'água 600 mm e 1200 mm. Após abrasão, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel absorvente.

Voltamogramas cíclicos foram obtidos com ambos os eletrodos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, para avaliar a resposta voltamétrica do eletrodo a 20, 50, 70, 150, 200, 300 mV/s entre -0,2 V e +0,60 V.

Voltamogramas cíclicos também foram obtidos para compósitos contendo diferentes concentrações de BSA (0,00; 0,156; 0,312; 0,416 e 0,520 mg/mL) com velocidade de varredura de 100 mV/s, e potenciais entre -0,2 e +0,6 V.

1.1.7 Determinação da Hb em eletrodo modificado com hemoglobina e compósito a base de cola de silicone

Foi pesado 70 mg de grafite, 20 mg de silicone e adicionado 10 μ L de solução de Hb (13,7 mg/mL). A mistura foi homogeneizada por 10 minutos em almofariz de vidro, inserida em tubos de vidro ($\varnothing=3,0$ mm). Uma vez inserido no tubo de vidro, fez-se o contato elétrico com um fio de cobre, sendo realizada uma corrida com potencial entre +0,6 e -1,2 V em $v=100$ mV/s.

2 ESTUDOS DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO

2.1 Determinação de BSA por meio de interação com corantes

2.2.1 Preparo dos corantes e ensaios de interação

Foram preparados 0,5 mL de solução 0,01 % de corante em tampão fosfato pH de 5 em tubos de 2 mL dos seguintes corantes: azul de metileno, verde de bromocresol, azul de metileno, 2,6-diclorofenolindofenol-sal, azul de coomasie e azul brilhante. Em seguida, os eletrodos foram imersos nos tubos por 2 minutos. O eletrodo foi lavado com água destilada para retirar o excesso de corante, e seco em temperatura ambiente. A corrida foi realizada em 5 mL de tampão fosfato usando potencial entre +0,8 e -0,8 V, a uma velocidade de varredura de 100 mV/s e, em seguida seco cuidadosamente com auxílio de papel de filtro. Adicionou-se posteriormente 2 μ L de Hb, para então ser realizada a corrida com os mesmos parâmetros em solução-tampão.

2.3 Determinação citocromo c e Hb em eletrodo de ouro com membrana de diálise

Adicionou 2 μL de solução de cit c e Hb na superfície do eletrodos de Au, deixou-se secar a temperatura ambiente, em seguida a ponta do eletrodo foi selada com uma membrana de diálise. Foi realizada uma varredura com potencial entre +0,6 e -0,6 V em com uma velocidade de varredura de 100 mV/s.

3 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS COM ELETRODOS COMPÓSITOS

3.1 Determinação de Hemina, Hb e BSA através de eletrodos compósitos

3.1.1 Eletrodo de compósitos de silicone com Hemina

Foram pesados 70 mg de grafite, 20 mg de silicone e 10 mg de Hemina. Em seguida, foi realizada uma corrida com potencial entre +0,6 e -1,2 V, com varredura a 100 mV/s.

3.1.2 Eletrodo modificado com Hemina e parafina

Foram pesados 57 mg de grafite, 25 mg de Hemina e 9 mg de parafina triturada, misturados até que ficaram homogêneos e aquecidos até 65°C. Um tubo de vidro foi preenchido com essa mistura ainda no estado líquido, sendo em seguida seco e polido até obter uma imagem especular com papel de seda. Por fim, foi realizada uma corrida usando uma solução tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹, pH de 7,2 adicionado a uma solução de Hb (10 mg/mL) e com BSA (1 mg/mL) em solução com um potencial entre +0,6 e -1,2 V, a uma velocidade de varredura de 100 mV/s, e corrente de 500 μA .

Em seguida, foi pesado 10 mg de BSA dissolvida em 1,0 mL de tampão e transferidas para um frasco contendo 10⁻³ mol.L⁻¹ de

HCl em seguida realizado uma corrida com 5 mL de HCl e 0,5 mL de BSA com potencial entre +0,2 e -0,8, com varredura de 100 mV/s.

3.2 Determinação de proteínas em eletrodo modificado com filmes compósitos a base de Nafion

3.2.1 Filmes compósitos de Nafion em eletrodo de pasta de carbono

Adionou-se 2 μ L de Nafion em um eletrodo de pasta de carbono, em seguida foi realizada uma corrida a +0,6/-0,6 em 100mV/s. Depois o eletrodo foi lixado e feito o ensaio com Ferricianeto de potássio. Secado e adicionado 2 μ L de citocromo c e deixado secar em temperatura ambiente com uma ponteira de pipeta durante 24h. Por fim, foi feita uma corrida com potencial entre +0,6 e -0,6 V em uma velocidade de varredura de 100 mV/s. Foi repetido o mesmo procedimento utilizando um eletrodo grafitado.

3.2.2. Filmes compósitos de Nafion em carbono vítreo

Adicionou-se 2 μ L de proteína de uma solução 10 mg/mL de cit c e Hb em dois eletrodos. Em seguida, foi deixado secar durante 20 minutos, adicionou-se 2 μ L de Nafion 5% (v/v) e deixou secar por 20 minutos. Por fim, foi feita uma corrida em tampão fosfato com um potencial de +0,8/-0,8 a uma velocidade de varredura de 100 mV/s)

3.2.3 Imobilização de proteínas com filmes compósitos de Nafion e cisteína

Foi realizada a limpeza do eletrodo com clorofórmio e polido com papel de seda e feita uma corrida com o potencial entre 0,2 e +1,5 V, a uma velocidade de varredura de 100 mV/s

em solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 . Foi feita uma corrida em solução de tampão $+0,8/-0,8 \text{ V}$, a uma velocidade de varredura 100 mV/s . Adicionou-se $2 \mu\text{L}$ de Nafion 5% (v/v) e deixado secar por 20 minutos. Foi adicionado $2 \mu\text{L}$ de cisteína ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e deixado secar. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água destilada. Por fim, foi adicionado $2 \mu\text{L}$ de proteína (Hb e Cit c) e deixado a secar. Foi realizada uma corrida em tampão com um potencial entre $+0,8$ e $-0,8 \text{ V}$, a uma velocidade de 100 mV/s . E também foi realizada uma corrida em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ em KCl.

3.2.4 Imobilização de proteínas com filmes compósitos com Nafion - riboflavina

Foi feito um polimento em dois eletrodos de Au e uma corrida em H_2SO_4 , lavado com água destilada e em seguida uma corrida em tampão fosfato. Foi adicionado $2 \mu\text{L}$ de Nafion (5%) e deixado a secar durante 20 min. Em seguida, o eletrodo foi imerso em solução riboflavina 10 mM e deixado secar durante 10 minutos. Lavado com água destilada. Por fim, foi adicionado $2 \mu\text{L}$ de proteínas (Hb e Cit c) em cada eletrodo e deixado para secar durante 30 minutos. Lavados com água destilada. Em seguida, foi feita a varredura em tampão fosfato a um potencial entre $+0,8$ e $-0,8$, com $v=100 \text{ mV/s}$ e também em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ em KCl.

3.3 Determinação citocromo c, Hb em eletrodo de ouro com membrana de diálise

Adicionou $2 \mu\text{L}$ de solução de Cit c e Hb na superfície do eletrodos de Au, deixou-se secar a temperatura ambiente, em seguida a ponta do eletrodo foi selada com uma membrana de diálise. Foi realizada uma varredura com potencial entre $+0,6$ e $-0,6 \text{ V}$ em com uma velocidade de varredura de 100 mV/s .

3.4 Determinação de Hb em eletrodo de pasta de carbono modificado com SDS e Triton X -100

Foi preparado 1,0 mL de solução de Triton X-100, $2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, adicionou-se no eletrodo de pasta de carbono 5 µL de triton X-100 juntamente com Hb na proporção 1:1(v/v) deixado a secar em temperatura ambiente, colocou-se a membrana com cuidado na ponta do eletrodo e foi realizada uma varredura com potencial entre +0,4 e -0,4 V a uma velocidade de varredura de 20 mV/s em tampão fosfato pH de 7,0 com $0,1 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de perclorato de sódio(LOJOU,2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, os resultados obtidos de voltametria cíclica de proteínas em solução ou imobilizadas foram satisfatórios, embora a baixa reprodutibilidade dos mesmos tenha exigido a busca de formas alternativas para a parametrização eletrocatalítica de proteínas, posto que o objetivo central do trabalho refere-se às quantidades termodinâmicas obtidas em experimentos de voltametria cíclica com varredura termal contínua.

4.1 Imobilização em filmes compósitos.

4.1.1 Determinação da albumina de soro bovino em eletrodo de ouro modificado com L-cisteína em solução tampão acetato pH de 4,7

A Figura 4 mostra o voltamograma obtido na determinação da BSA em eletrodo de ouro modificado com filmes compósitos de L-cisteína. Pelo voltamograma, pode-se concluir que com a adição da BSA ocorreu um aumento significativo do pico de corrente anódico a -433 Mv. Indicando que houve formação de um composto ativo.

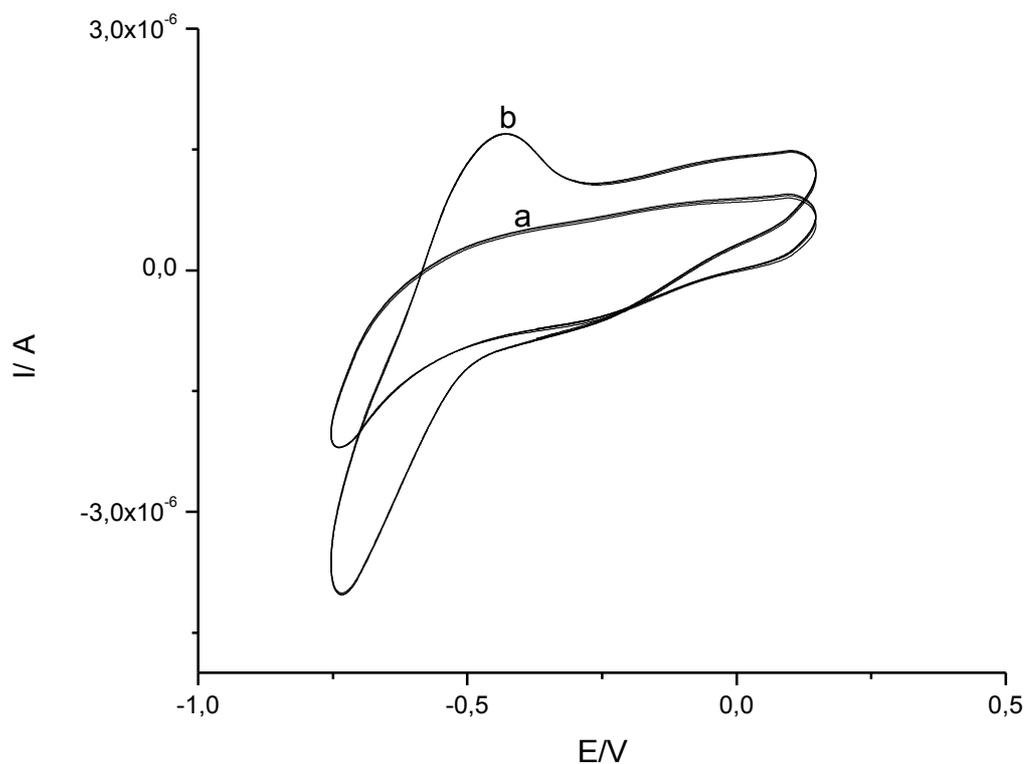


FIGURA 4 - Voltamograma cíclico obtido de a) L-cisteína em tampão Acetato pH de 4,7 e b) BSA imobilizada em eletrodo de Au modificado com L-cisteína

4.1.2 Determinação de Hb em filmes surfactantes de riboflavina e Nafion

De acordo com a Figura 5, pode-se inferir que o a corrente de pico anódico não está muito evidente, indicando que houve interação entre Hb e o eletrodo de filme composto de Hb-nafion-riboflavina em eletrodo de Au.

No caso do eletrodo composto de Hb-nafion-riboflavina, Figura 6, pode-se observar que ocorre um aumento do sinal em relação ao tampão, indicando uma melhor interação entre a Hb e o eletrodo composto.

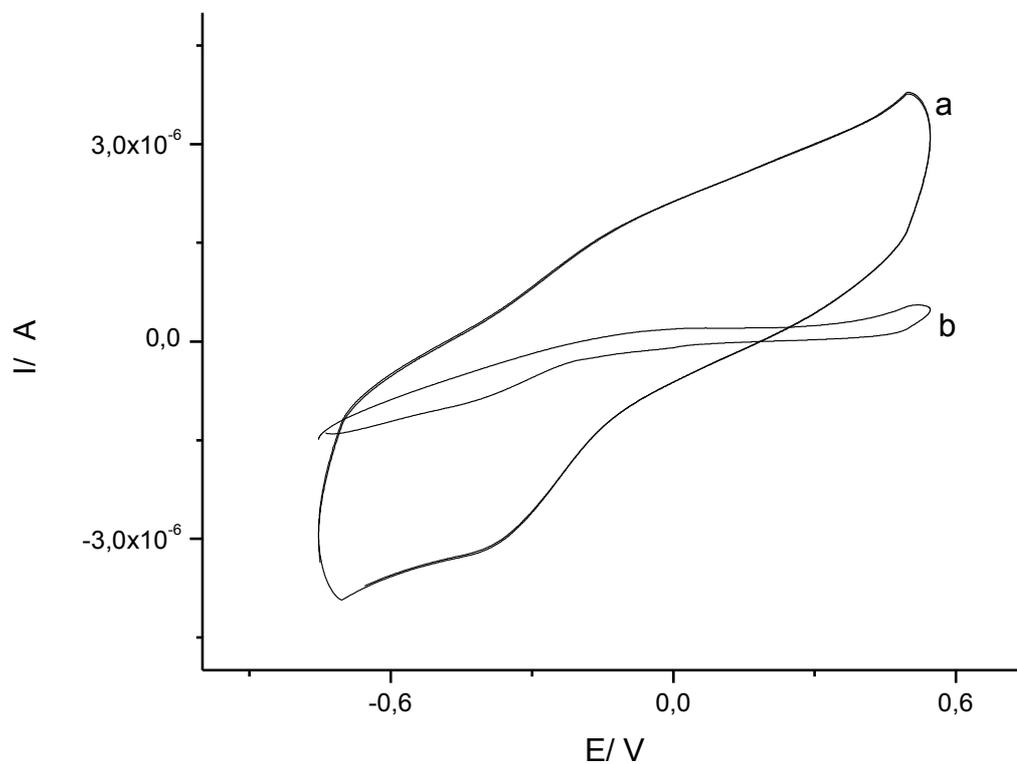


FIGURA 5- Voltamograma cíclico de (a) Hb-Nafion-Riboflavina em eletrodo de Au e (b) em solução tampão fosfato pH de 7,2 a uma varredura de 100 mV/s.

TABELA 1

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da Figura 5.

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μ A)	I_{pc} (μ A)
0,38	-0,06	-3,16	1,89

4.1.3 Determinação da Hemoglobina em eletrodo de filmes compósitos de Nafion

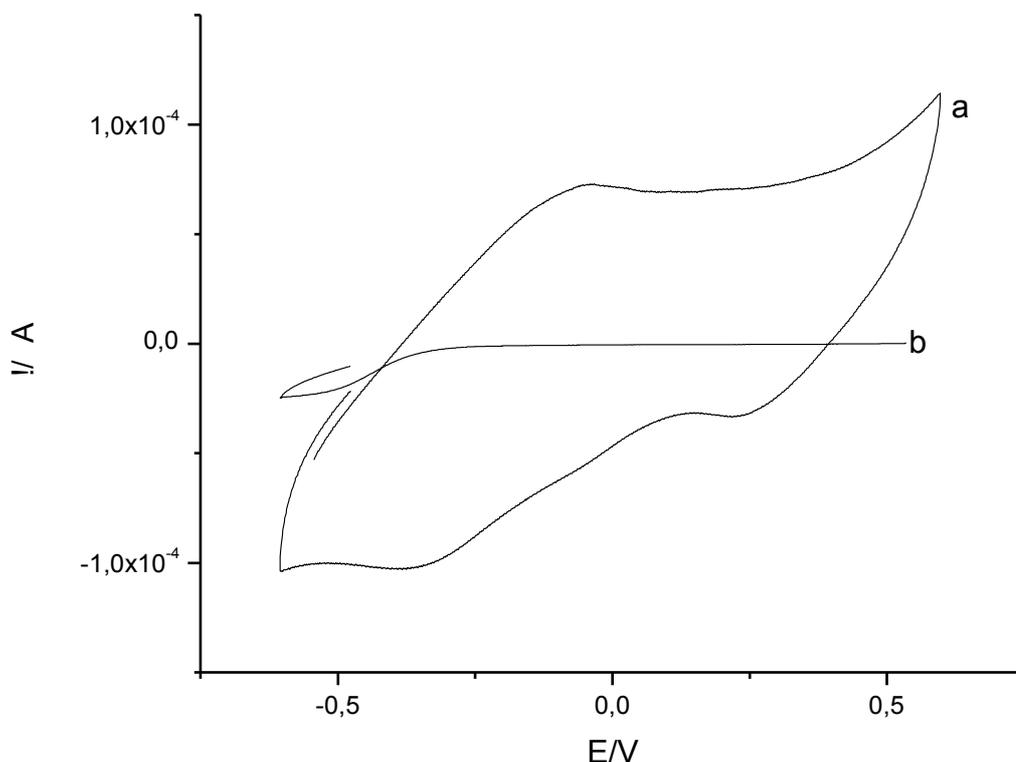


FIGURA 6- Voltamogramas cíclicos obtidos em velocidade de varredura de 100 mV/s ,utilizando (a) Hb –Nafion em eletrodo de pasta de carbono (a)em tampão fosfato , pH de 7,2.

TABELA 2

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da figura 6

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μ A)	I_{pc} (μ A)
0,23	-0,05	-32,09	72,78

4.1.4 Determinação de Hb em filmes compósitos de lecitina em eletrodo de pasta de carbono

De acordo com a Figura 7, podem-se visualizar os picos de corrente catódico e anódicos, bem como os potenciais de pico anódico e catódico, com os valores apresentados na Tabela 3.

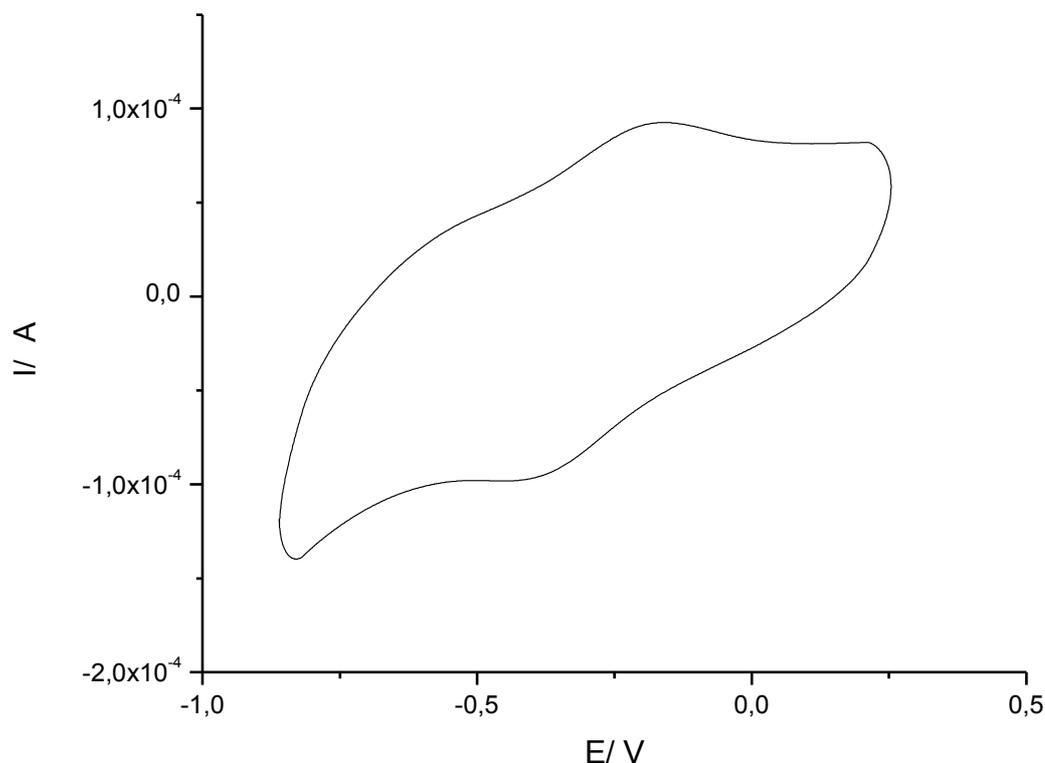


FIGURA 7 - Voltamograma cíclico obtido com eletrodo de filme compósito Hb-Lecitina em eletrodo de pasta de carbono em solução 0,1 M de tampão fosfato pH de 7,2 a uma varredura a 20 mV/s.

TABELA 3

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da Figura 7

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
-0,18	-0,40	92,95	-98,28

4.1.4.1 Efeito da velocidade da varredura

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de Hb-lecitina em pasta de carbono foi investigado em solução 0,1 M de tampão PBS, pH de 7,2. Os resultados obtidos, variando a velocidade de varredura entre 20 e 180 mV/s, são apresentados na Figura 8. Os voltamogramas cíclicos mostram um aumento na intensidade de corrente de pico

e um deslocamento de potencial anódico para valores superiores e catódico para valores inferiores.

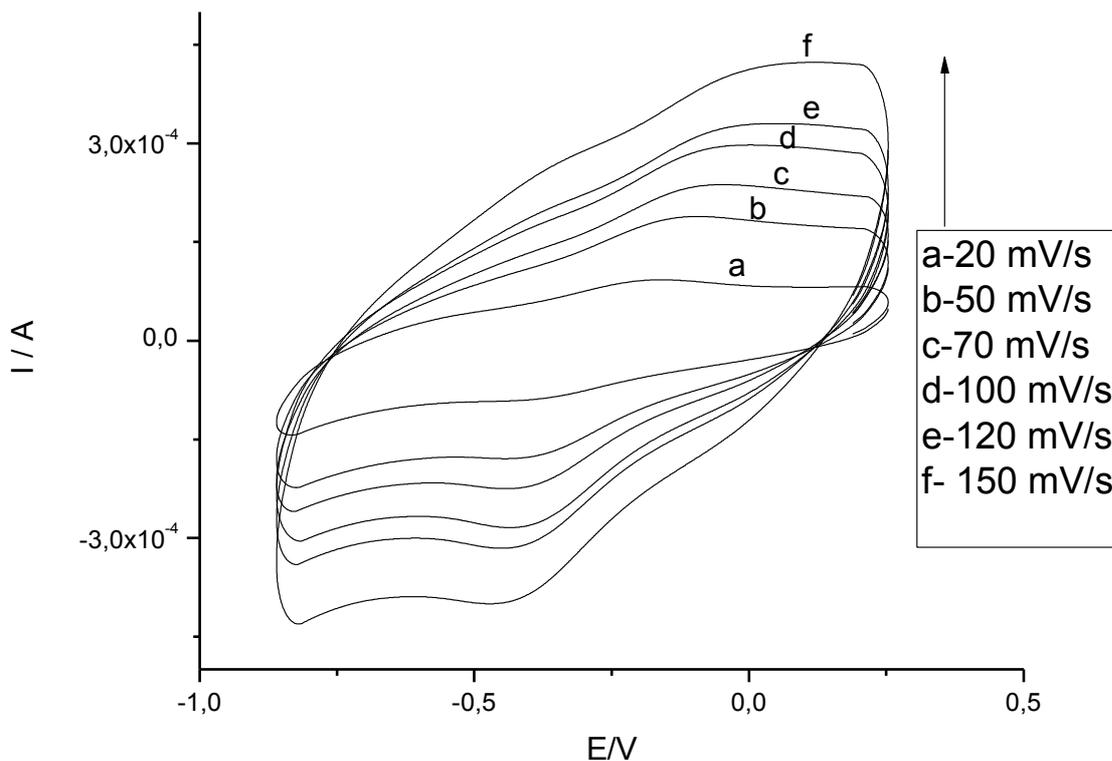


FIGURA 8- Voltamogramas cíclicos obtidos em velocidades de varredura entre 50 e 180 mV/s, utilizando Hb - lecitina em eletrodo de pasta de carbono em tampão fosfato , pH de 7,2.

Na Tabela 4, são apresentados os valores de ΔE_p que mostram uma tendência de aumento com a velocidade de varredura, sugerindo que a transferência de elétrons é dificultada em valores de taxa de varredura mais elevada. A melhor resposta foi obtida na varredura a 20 mV/s.

A análise da dependência das correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indica uma transferência de carga controlada por difusão no eletrodo (SANTOS,2007).

TABELA 4

Resultados de corrente e potencial de pico anódico e catódico para voltamogramas cíclicos utilizando Hb-lecitina(Figura 8) em eletrodo de pasta de carbono em tampão fosfato, pH de 7,2 em diferentes velocidades de varreduras entre 20 e 180 mV/s.

v / (mV/s)	E_{pa} / mV	E_{pc} / mV	I_{pa} / μ A	I_{pc} / μ A	ΔE_p / mV
20	-170,2	-419,7	94,1	-96,7	249,5
50	-89,7	-415,3	190,4	-179,5	325,5
70	-29,5	-425,0	295,2	-284,2	395,5
100	3,17	-424,2	330,3	-311,9	427,3
120	37,1	-433,0	380,7	-361,1	470,2
150	51,2	-415,3	423,1	-394,7	466,5

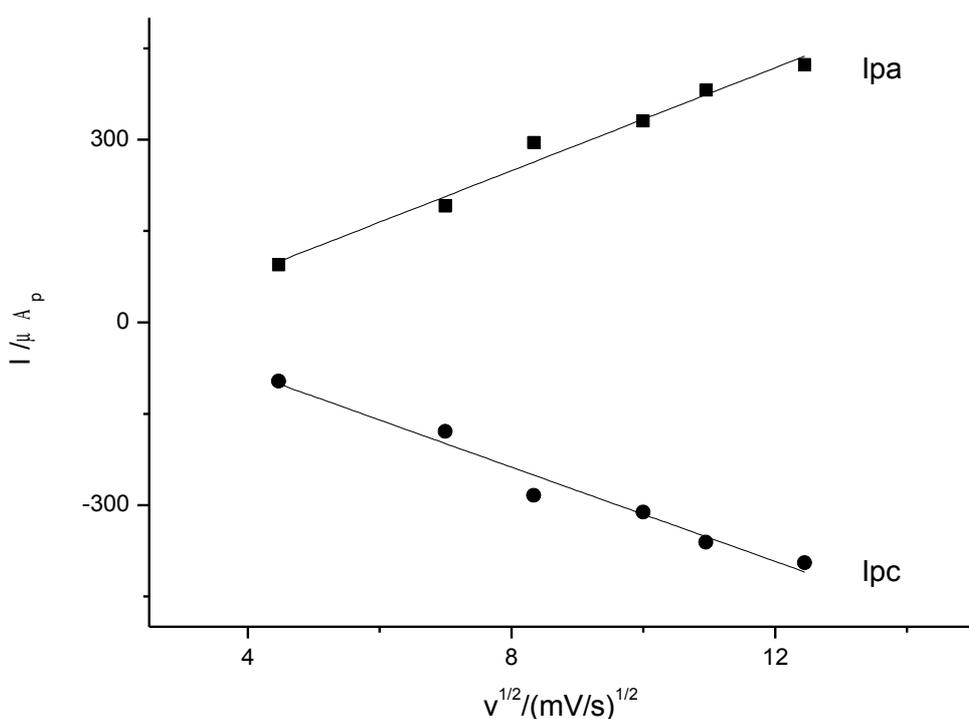


FIGURA 9 - Dependência das correntes de pico anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura entre 20 e 150 mV/s, para o eletrodo composto Hb-Lecitina em pasta de carbono em solução tampão pH de 7,2.

A análise da dependência das correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), com a raiz quadrada da velocidade de varredura, mostrado na Figura 9, indica uma transferência de carga controlada por difusão no eletrodo (SANTOS, 2007)

4.1.5 Voltametria cíclica de bsa em eletrodos compósitos em eletrodo de carbono com cola de silicone

Esses eletrodos possuem a vantagem de apresentar relativa facilidade de construção, baixo custo, sensibilidade e facilidade de renovação da superfície.

De acordo com a Figura 10, podemos ver que ocorre mudanças das correntes de pico (anódico-redução e pico catódico-aumento); no caso dos potenciais anódicos e catódicos, houve um deslocamento para valores superiores (potencial de pico anódico) e para valores negativos (potencial de pico catódico).

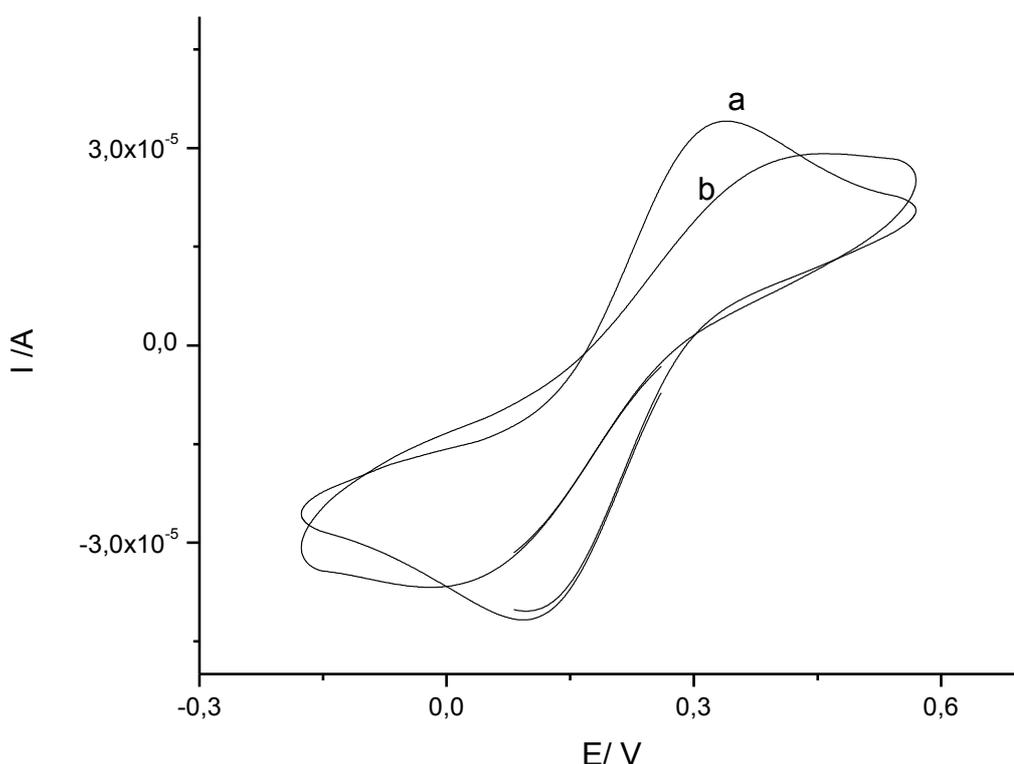


FIGURA 10 - Voltamogramas cíclicos obtido com eletrodo de compósito Com cola de silicone e pasta de carbono: a) solução de ferricianeto $0,5 \text{ molL}^{-1}$ e b) solução de BSA.

4.1.5.1 Voltametria cíclica de BSA immobilizada em eletrodo compósito de cola de silicone variando a concentração de BSA

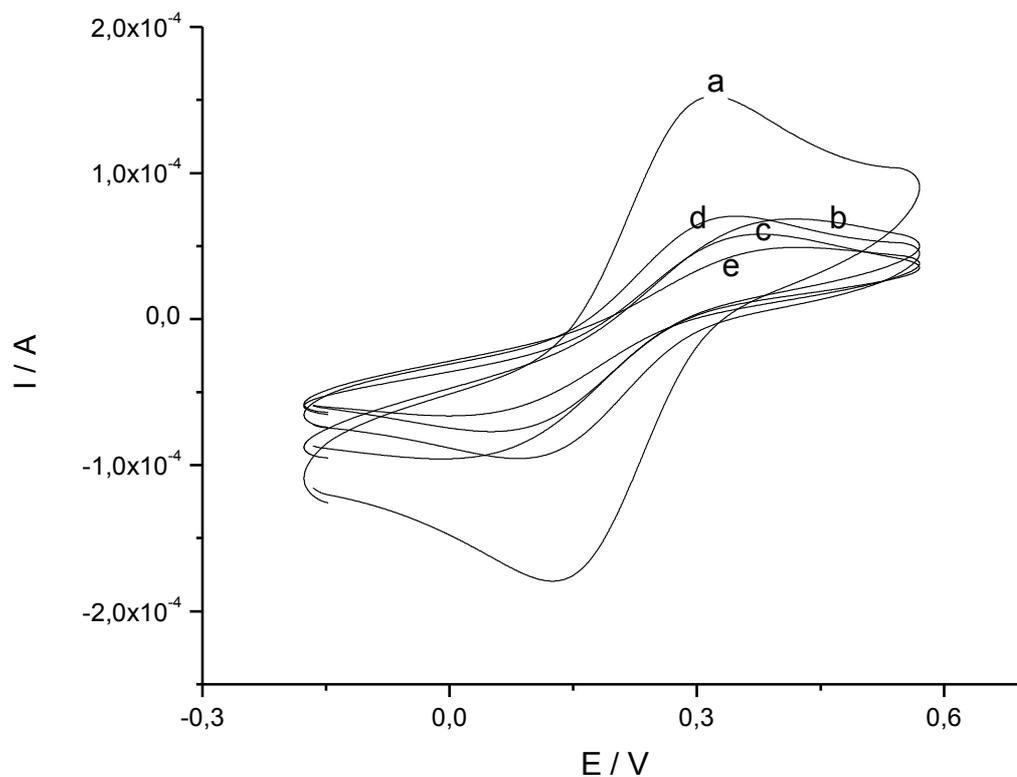


FIGURA 11 - Voltamograma obtido variando a concentração de BSA em eletrodo compósito de pasta de carbono com borracha de silicone em ferricianeto 5mM: a- BSA ausente ; b - 0,156 g/mL de BSA; c - 0,312 g/mL de BSA; d - 0,416 g/mL de BSA ; e - 0,520 g/mL de BSA.

4.1.6 Determinação do citocromo c em eletrodo de filme compósito, com glutaraldeído como agente promotor

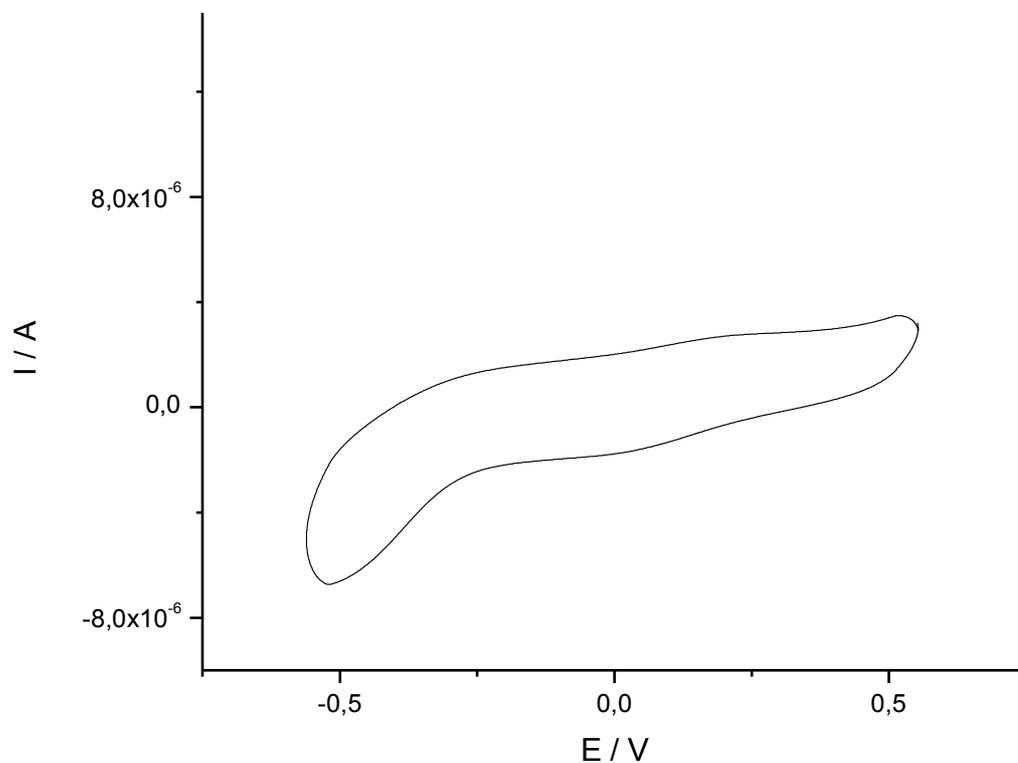


FIGURA12 - Voltamograma cíclico de tampão fosfato $0,1$ M , pH de $7,2$, com eletrodo de Au.

TABELA 5

Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da Figura 13.

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μ A)	I_{pc} (μ A)
0,23	-0,04	0,09	0,05

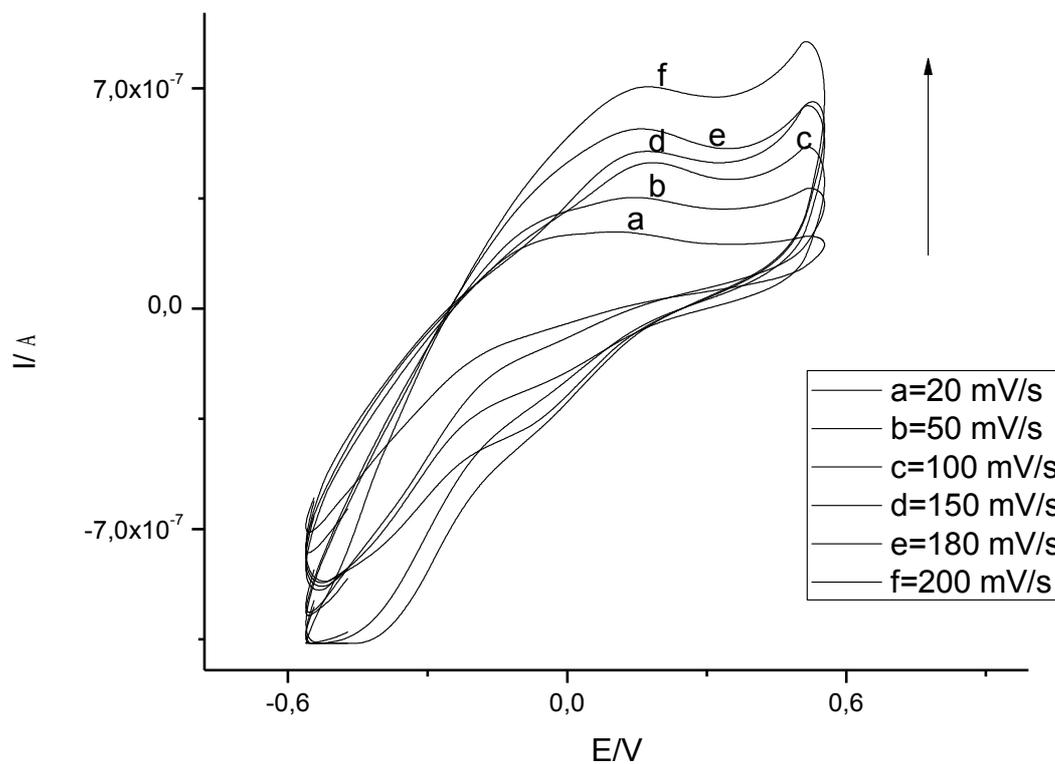


FIGURA 13- Voltamogramas cíclicos obtidos em velocidades de varredura entre 20 e 200 mV/s ,utilizando citocromo c imobilizado em cisteina -glutaraldeido em eletrodo de Au em tampão fosfato, pH de 7,2.

TABELA 6

Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da Figura 14

$v/(mV/s)$	E_{pa} / V	E_{pc}/V	$I_{pa}/\mu A$	$I_{pc} /\mu A$	$\Delta E_p/ V$
20	0, 10	-0, 05	0, 24	-0, 06	0, 15
50	0, 14	-0, 02	0, 35	-0, 11	0, 17
100	0, 17	-0, 06	0, 46	-0, 24	0, 23
150	0, 17	-0, 07	0, 49	-0, 37	0, 25
180	0, 15	-0, 06	0, 56	-0, 30	0, 22
200	0, 15	-0, 06	0, 70	-0, 39	0, 21

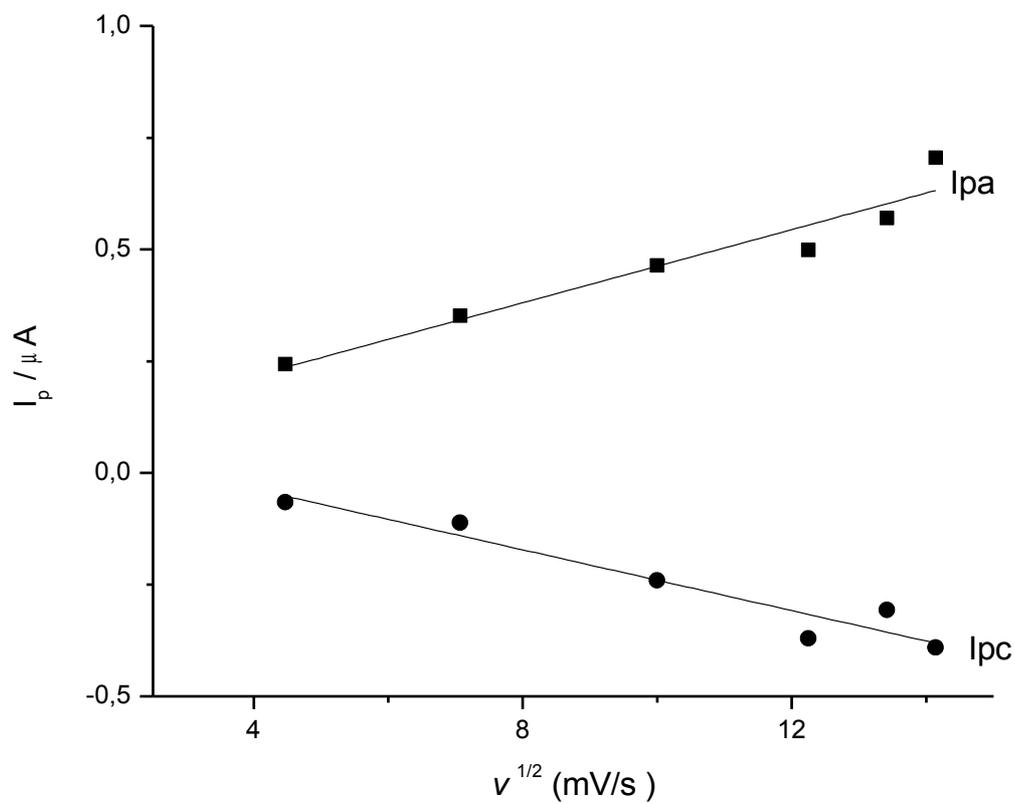


FIGURA 14 - Dependência das correntes de pico anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura, entre 20 e 200 mV/s em solução tampão fosfato, pH de 7,2.

4.2 Determinação de BSA em eletrodo de pasta de carbono imobilizada através de ligação covalente com dopamina

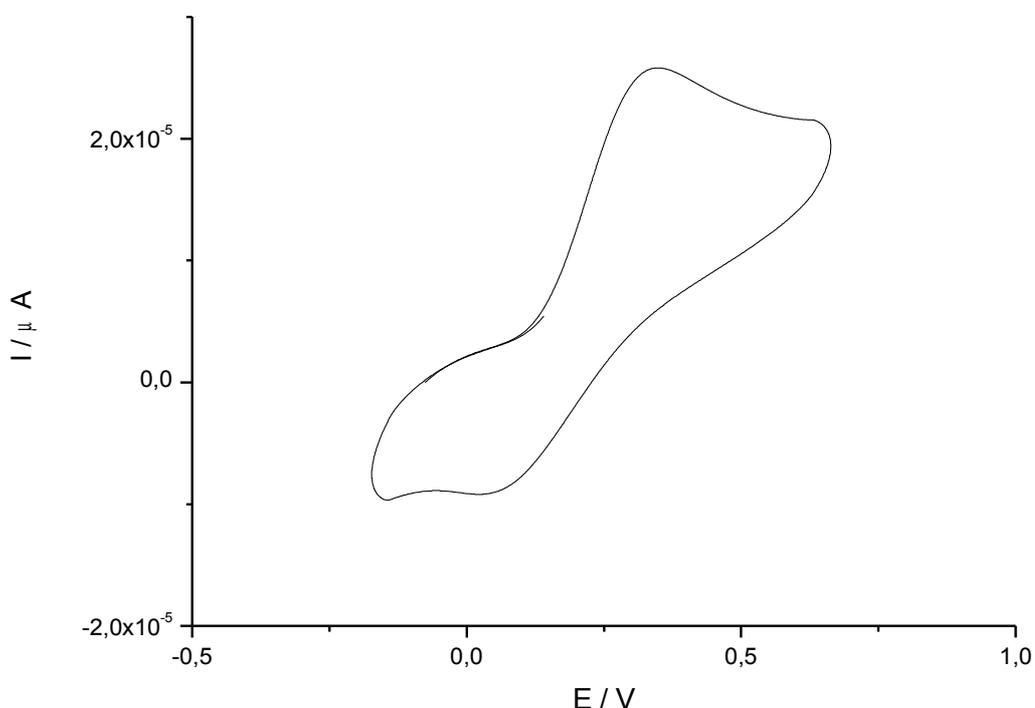


FIGURA 15 - Voltamograma cíclico obtido em velocidade de varredura de 100 mV/s da dopamina em eletrodo de pasta de carbono em tampão fosfato, pH de 7,2, $v=100$ mV/s

TABELA 7

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da Figura 18.

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μ A)	I_{pc} (μ A)
0,337	0,059	25,772	-8,837

De acordo com a Figura 15, comparada com a Figura 16, pode ser visualizado uma mudança significativa nos valores dos picos de corrente catódica e anódica, bem como dos potenciais de pico anódico e catódicos, indicando que houve interação entre a BSA imobilizada covalentemente pela dopamina e a superfície do eletrodo.

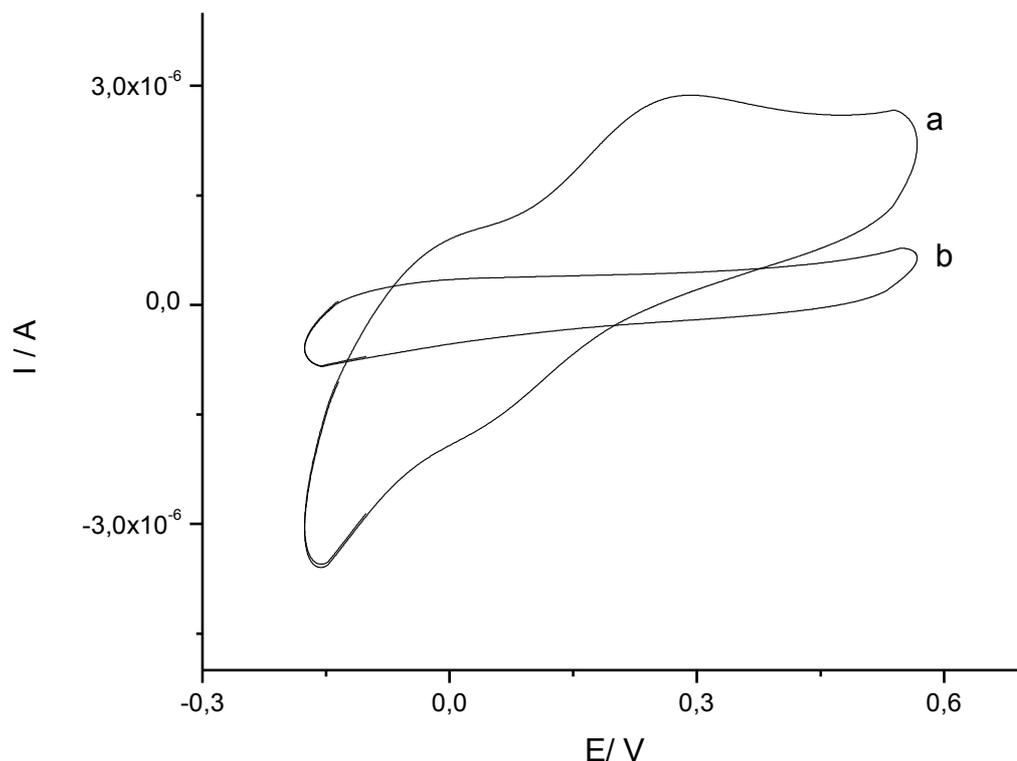


FIGURA 16- Voltamograma cíclico obtido em velocidade de varredura de 100 mV/s de:(a) BSA -dopamina(tubo 3) eb- BSA em tampão fosfato, pH =7,2 com $v=100$ mV/s.

TABELA 8

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da Figura 16.

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
0,271	-0,037	2,825	-1,711

4.3 Determinação de proteínas imobilizadas por adsorção

4.3.1 Interação com azul de bromocresol

Pela análise do voltamograma da Figura 17, pode-se perceber que com adição de BSA, ocorre um aumento do sinal da corrente tanto no pico anódico (I_{pa}), quanto no pico catódico (I_{pc}) em relação ao tampão. Esse resultado indica que houve uma interação entre BSA e o corante azul de bromocresol, indicando

que o corante atua como mediador, aumentando o sinal eletroquímico da BSA.

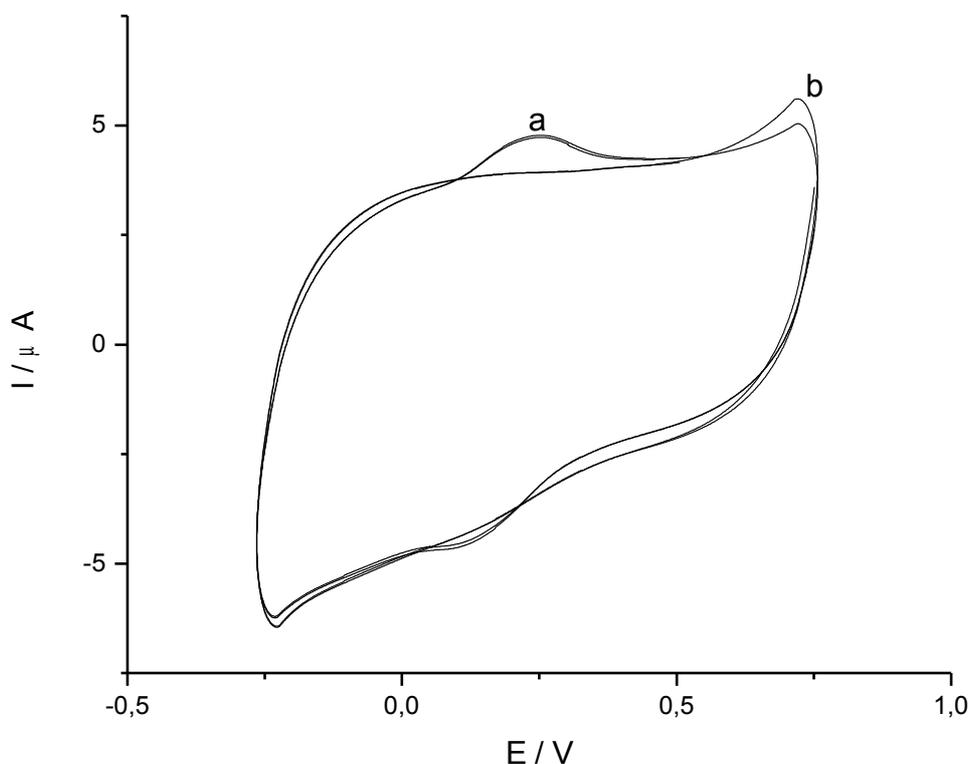


FIGURA 17 - Voltamograma cíclico obtidos em velocidades de varredura de 100 mV/s de BSA , utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com corante azul de bromo cresol em tampão fosfato, pH de 7,2.

TABELA 9

Parâmetros voltamétricos obtidos a partir do voltamograma da Figura20.

E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
0,25	0,11	47,73	-45,22

4.3.2 Determinação de BSA em eletrodo modificado com dopamina

Pela análise da Figura 20, podemos observar que houve um deslocamento da corrente de pico anódico e também do potencial

de pico anódico; já em relação à corrente de pico catódico e ao potencial de pico catódico (parte inferior), não houve mudanças significativas.

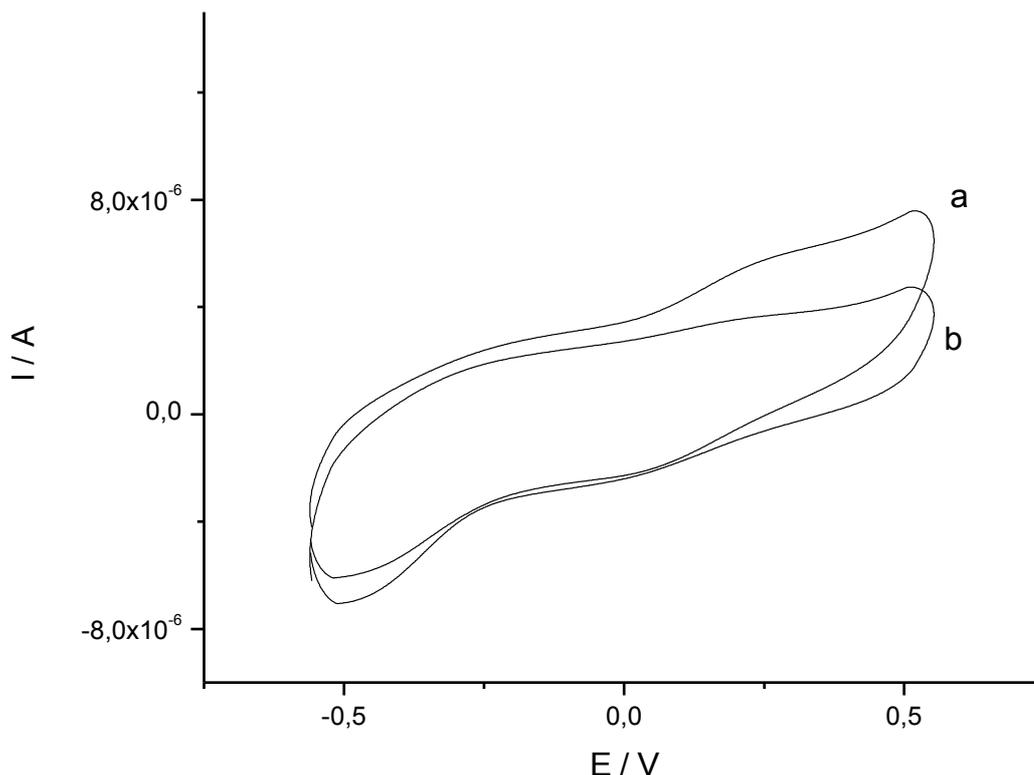


FIGURA 18- Voltamogramas cíclicos obtido em velocidade de varredura de 100 mV/s de: a) BSA em eletrodo modificado de pasta de carbono em dopamina e b) tampão fosfato, pH de 7,2.

4.5 Determinação da hemoglobina imobilizada em eletrodo modificado com hemoglobina

De acordo com a Figura 19, podemos sugerir que houve interação entre o eletrodo de pasta de carbono modificado com Hb, devido às mudanças nos valores tanto dos picos de potenciais anódicos e catódicos, como nos picos de correntes catódicos e anódicos.

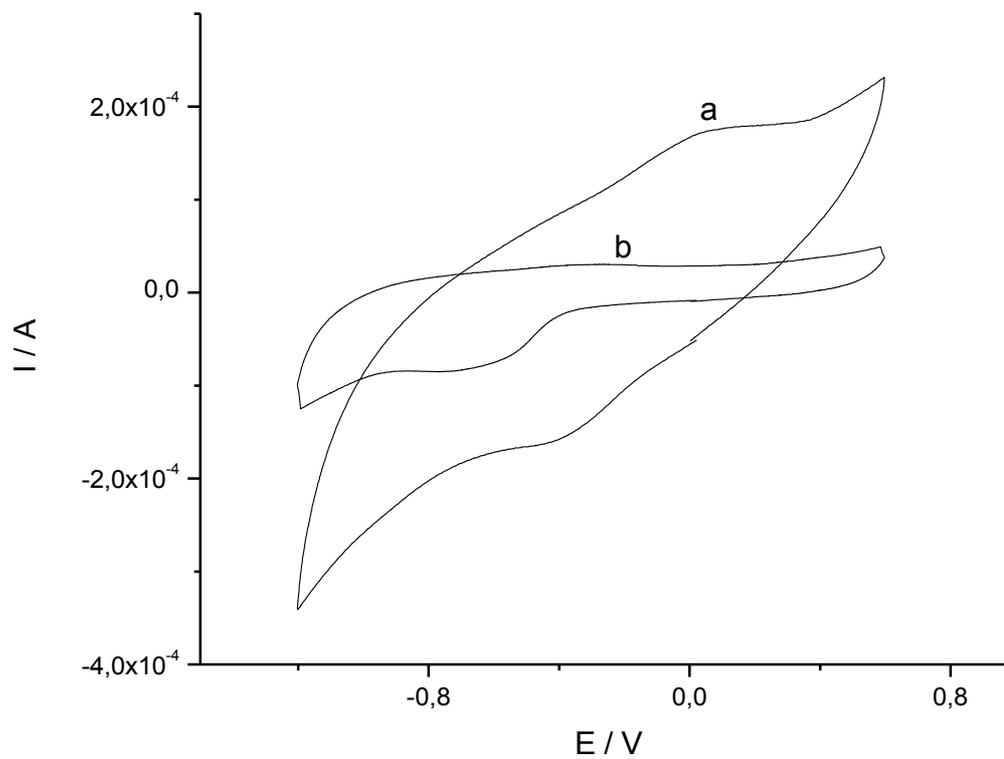


FIGURA 19- Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com hemoglobina (a) e tampão fosfato pH de 7.2 (b) com $v= 100$ mV/s.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que os eletrodos compósitos utilizados nesse trabalho constituem uma alternativa promissora como material eletródico. Os compósitos que apresentaram melhor resposta foram: cisteína-glutaraldeído e cola de silicone

Podemos concluir também que, no caso de imobilização por adsorção, o eletrodo com corante como mediador foi o que obteve melhor resposta. No caso da imobilização por ligação covalente a BSA ligada a dopamina foi a que obteve a melhor resposta como material eletródico, constituindo a escolha final para os ensaios eletroquímicos vindouros.