

Isabel Patrícia Garrido Fernandes

MECANISMOS ELETROQUÍMICOS DE DERIVADOS DA ISATINA E DE PROTEÍNAS MEMBRANARES CALMODULINA E CAVEOLINAS

Tese de Doutoramento em Química, ramo de Eletroquímica, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira-Brett e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ISABEL PATRÍCIA GARRIDO FERNANDES

**MECANISMOS ELETROQUÍMICOS DE DERIVADOS
DA ISATINA E DE PROTEÍNAS MEMBRANARES
CALMODULINA E CAVEOLINAS.**

**Dissertação submetida à
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
para a obtenção do grau de Doutor em Química,
no ramo de Eletroquímica**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

2017

“O que nós observamos não é a própria natureza, mas o que o nosso método de interrogar nos revela como natureza.”

Werner Heisenberg

AGRADECIMENTOS

Durante estes anos foram muitas as pessoas que contribuíram, apoiaram e apresentaram sugestões. A todas gostaria de expressar a minha gratidão uma vez que constituíram um precioso auxílio na realização deste trabalho e sem as quais teria sido muito difícil chegar a bons resultados.

Em primeiro lugar, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett pelo carinho e confiança manifestada ao acolher-me no seu grupo de investigação. A sua orientação e conhecimentos científicos, os seus ensinamentos e disponibilidade constantes foram fundamentais ao longo destes anos para a minha formação e crescimento científico.

Ao Professor Doutor Christopher Michael Ashton Brett pelos conselhos científicos no decorrer dos anos de doutoramento.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro, bolsa de doutoramento SFRH/BD/87334/2012, e ao Instituto Pedro Nunes pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

Aos meus colegas do Instituto Pedro Nunes, ao Adrian, Victor, Bruno, Márcia, Catarina, Dora e também à Madi e Madalina, agradeço a amizade, os momentos de companheirismo e por estarem sempre disponíveis quando necessário. À Ana, obrigada por estares sempre disponível, pela ajuda preciosa na escrita e nas correções. Ao Carlos, obrigada por me teres recebido tão bem e por todos os ensinamentos partilhados, enriqueceram bastante a minha experiência científica.

A todos os meus amigos, em especial à Sara, Filipa, Sofia e Rita, agradeço por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, pelo carinho constante e por saber que posso contar sempre com vocês.

A toda a minha família em especial à minha mãe, desejo agradecer toda a ajuda e carinho constante.

Ao meu filho Xavier e ao meu marido Serge Nunes, vocês são o meu porto seguro! Agradeço todo o amor, apoio e incentivo permanentes e toda a paciência que tiveram comigo ao longo deste último ano. Agradeço também todos os preciosos conselhos necessários à escrita.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Os mecanismos eletroquímicos da isatina e de trinta compostos indólicos derivados da isatina, que possuem um amplo perfil farmacológico, e das proteínas membranares calmodulina e caveolinas 1, 2, 3, foram investigados utilizando técnicas voltamétricas, no eletrodo de carbono vítreo. Estas moléculas estão interligadas ao nível biológico, uma vez que a calmodulina, que tem um papel fundamental na sinalização e regulação dos canais de cálcio, é também uma proteína de ligação de várias moléculas, entre as quais a isatina. Além disso, a calmodulina, quando ligada com o cálcio, intervém na mediação de reações biológicas, e em alguns mecanismos de acção das caveolinas, tais como na libertação e ativação da enzima eNOS que interage com a caveolina 1 nas células endoteliais.

A isatina e os seus derivados participam num elevado número de reações de síntese orgânica, que levam ao desenvolvimento de moléculas com perfil farmacológico muito vasto e diversas aplicações clínicas, devido às suas propriedades antimicrobianas, anticancerígenas e anti-inflamatórias. A influência dos grupos substituintes nitrogenados, halogenados, morfolino, hidroximetil e metil dos derivados da isatina, no comportamento eletroquímico da isatina, foi avaliada e foram observados mecanismos redox diferentes, característicos de cada grupo funcional. De todos os grupos funcionais, os átomos de halogéneo, Cl, F, Br, I, foram os que influenciaram mais fortemente os processos redox da isatina. Foram propostos mecanismos de oxidação e redução para todos os derivados da isatina estudados.

A oxidação da calmodulina, no estado nativo e desnaturado, foi investigada por voltametria de impulso diferencial e por espectroscopia de impedância eletroquímica, com base no comportamento eletroquímico dos resíduos dos aminoácidos eletroativos tirosina, histidina e metionina. As alterações conformacionais provocadas pela

agregação dos íons de cálcio na calmodulina foram estudadas por voltametria de impulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. A microbalança de cristais de quartzo permitiu determinar a agregação de íons de cálcio na superfície da grafite modificada com calmodulina.

A oxidação das proteínas caveolinas no estado nativo foi investigada por voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada e foi observado apenas um processo de transferência de electrão, correspondente à oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina, triptofano e cisteína. A caveolina 2 foi desnaturada tendo sido observadas alterações significativas na resposta eletroquímica. A interação das caveolinas 1, 2 e 3 com o colesterol foi investigada, e foi confirmada, como era de esperar, a interacção com a caveolina 1, enquanto as caveolinas 2 e 3 mostraram um comportamento eletroquímico inalterado na presença do colesterol.

A investigação do comportamento voltamétrico da calmodulina e das caveolinas fornece informação relevante, não apenas sobre os processos de oxidação na superfície do eléctrodo de carbono vítreo, mas também sobre as alterações estruturais e morfológicas.

ABSTRACT

The electrochemical behaviour of isatin and thirty isatin derivatives, that present a broad pharmacological spectrum, and of membrane proteins calmodulin and caveolins 1, 2, and 3, were investigated using voltammetric techniques at a glassy carbon electrode. These molecules are linked at biological level, since calmodulin, which plays a key role in signalling and regulation of calcium channels, it also binds to and regulates a number of diverse target molecules, including isatin. Furthermore, calmodulin bound to calcium is involved in the mediation of important biological responses, and in some caveolins mechanisms of action, such as the release and activation of the eNOS enzyme that interacts with caveolin 1 in endothelial cells.

Isatin and isatin derivatives participate in a large number of organic synthesis reactions, leading to the development of molecules with a very wide pharmacological profile and diverse clinical applications, due to their antimicrobial, anticancer and anti-inflammatory characteristics. The influence of the nitrogen, halogen, morpholino, hydroxymethyl and methyl substituents, on the electrochemical behavior of isatin, was evaluated, and different redox mechanisms were observed for each substituent functional group. From all functional groups, halogen atoms showed the strongest influence on the isatin redox behavior. Oxidation and reduction mechanisms for all isatin derivatives were proposed.

The oxidation process of calmodulin in native state and after denaturation was investigated by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, based on the electrochemical behavior of its electroactive amino acid residues tyrosine, histidine and methionine. The calmodulin conformational modifications, caused by calcium ions aggregation, were investigated by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The quartz crystal

microbalance allowed the determination of the calcium ions aggregation at the calmodulin modified graphite surface.

The oxidation process of caveolins in native state was investigated by cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, and only one anodic electron transfer process was observed, corresponding to the electroactive amino acid residues tyrosine, triptofan, and cystein. Caveolin 2 chemical denaturation led to significant changes in the electron transfer oxidation current. The caveolins 1, 2 and 3 interaction with cholesterol was investigated, and significant changes in the caveolin 1 oxidation were observed.

The calmodulin and caveolins voltammetric study provided relevant information not only concerning their oxidation behaviour, but also concerning their morphological modifications that occurred at the glassy carbon electrode surface.

ÍNDICE

Notação: Símbolos Principais	ix
Subscritos.....	x
Abreviaturas.....	xi
Constantes físicas fundamentais	xi

CAPÍTULO 1

Introdução.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Compostos aromáticos: indol	4
1.2.1 Isatina.....	5
1.2.1.1 Derivados nitrogenados da isatina.....	7
1.2.1.2 Derivados halogenados da isatina	9
1.2.1.3 Derivados da isatina com os substituintes morfolino, hidroximetil e metil	12
1.3 Proteínas	16
1.3.1 Estrutura e propriedades dos aminoácidos.....	16
1.3.2 Propriedades eletroquímicas dos aminoácidos	22
1.3.3 Estrutura das Proteínas	25
1.3.4 Oxidação das proteínas	31
1.3.5 Propriedades eletroquímicas das proteínas.....	34
1.3.6 Calmodulina.....	37
1.3.7 Caveolinas.....	41
1.4 Princípios da eletroquímica	45
1.4.1 Eléctrodo de carbono vítreo.....	50
1.4.2 Técnicas de voltametria	51
1.4.2.1 Voltametria cíclica.....	52
1.4.2.2 Técnicas de degrau e impulso	59
1.4.3 Espetroscopia de impedância eletroquímica.....	63
1.4.4 Microbalança de cristal de quartzo	69

CAPÍTULO 2

Experimental	73
2.1 Reagentes e soluções	75
2.2 Instrumentação.....	79
2.3 Parâmetros voltamétricos.....	81
2.4 Preparação da superfície dos eléctrodos.....	82
2.4.1 Modificação da superfície do GCE para desnaturação de proteínas.....	82

CAPÍTULO 3

Estudo Voltamétrico de Derivados Nitrogenados da Isatina	87
3.1 Oxidação eletroquímica	93
3.1.1 Voltametria cíclica.....	93

3.1.1.1	Isatina	93
3.1.1.2	5-Nitroisatina (5-NO ₂ -ISA)	94
3.1.1.3	Isatinas-hidrazonas (HIDISA)	94
3.1.1.4	Isatina-semicarbazona e Isatina-tiosemicarbazona	98
3.1.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH	99
3.1.2.1	Isatina	101
3.1.2.2	Isatina-3-hidrazona (HIDISA)	102
3.1.2.3	Isatina-3-semicarbazona (SEMISA)	106
3.1.3	Voltametria de onda quadrada	109
3.1.3.1	Isatina	109
3.1.3.2	Isatina-3-semicarbazona (SEMISA)	111
3.1.4	Mecanismos de Oxidação	112
3.1.4.1	Isatina	113
3.1.4.2	5-Nitro-isatina	115
3.1.4.3	Isatina-3-hidrazona e Isatina-3-semicarbazona	115
3.1.4.4	5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona	117
3.2	Redução Eletroquímica	118
3.2.1	Voltametria cíclica	118
3.2.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH	121
3.3	Conclusões	127

CAPÍTULO 4

Estudo Voltamétrico de Derivados Halogenados da Isatina		129
4.1	Oxidação eletroquímica	136
4.1.1	Voltametria cíclica	136
4.1.1.1	Derivados mono-halogenados da ISA	136
4.1.1.2	Derivados di-halogenados da ISA	139
4.1.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH	141
4.1.2.1	5-Flúor-isatina	141
4.1.2.2	7-Iodo-isatina	146
4.1.3	Voltametria de onda quadrada	148
4.1.3.1	5-Flúor-ISA	149
4.1.4	Mecanismo de oxidação	151
4.1.4.1	Derivados 5 (ou 7)-mono-halogenados da ISA	151
4.1.4.2	Derivados di-halogenados da ISA	153
4.2	Redução eletroquímica	154
4.2.1	Voltametria cíclica	155
4.2.2	Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH	159
4.2.3	Voltametria de onda quadrada	161
4.3	Conclusões	162

CAPÍTULO 5

Estudo Voltamétrico de Derivados da Isatina Substituídos com 1-morfolino, 1-hidroximetil, 1-metil e as suas Formas Halogenadas		163
5.1	Oxidação eletroquímica	170
5.1.1	Derivados 1-morfolinometil-ISA	170
5.1.1.1	Voltametria cíclica	170
5.1.1.2	Voltametria de impulso diferencial	173
5.1.1.3	Voltametria de onda quadrada	174

5.1.1.4	Mecanismo de oxidação	176
5.1.2	Derivados 1-hidroximetil-ISA	178
5.1.2.1	Voltametria cíclica	178
5.1.2.1	Voltametria de impulso diferencial	180
5.1.3	Derivados metil-ISA	181
5.1.3.1	Voltametria cíclica	181
5.1.3.2	Voltametria de impulso diferencial	183
5.1.3.3	Voltametria de onda quadrada	185
5.2	Redução eletroquímica	185
5.3	Conclusões	191

CAPÍTULO 6

Estudo Eletroquímico da Oxidação e das Alterações Conformacionais da Calmodulina Induzidas pelo Cálcio..... 195

6.1	Oxidação da CaM no estado nativo. Efeito do pH	199
6.2	Caraterização do filme multicamada de CaM no GCE por CV e EIS	202
6.3	Efeito dos agentes desnaturantes na oxidação da CaM	205
6.4	Caraterização eletroquímica das alterações conformacionais da CaM induzidas pelo cálcio	209
6.5	Caraterização por EIS das alterações conformacionais induzidas pelo cálcio	211
6.6	Caraterização gravimétrica das alterações conformacionais induzidas pelo cálcio	214
6.7	Conclusões	217

CAPÍTULO 7

Oxidação Eletroquímica das Caveolinas..... 219

7.1	Oxidação das caveolinas CAV-1 e CAV-2 no GCE	223
7.1.1	Voltametria cíclica.....	223
7.1.2	Voltametria de onda quadrada	226
7.1.3	Voltametria de impulso diferencial.....	226
7.2	Efeito dos agentes desnaturantes na oxidação da CAV-2	230
7.3	Caraterização eletroquímica da interação das caveolinas com o colesterol	234
7.4	Conclusões	237

CAPÍTULO 8

Conclusões.....	239
-----------------	-----

CAPÍTULO 9: Referências 249

CAPÍTULO 10: Artigos Publicados 275

Notação: Símbolos Principais

		<i>Unidades</i>
A	área	m^2
C	concentração	$mol\ cm^{-3}$ (M)
C	capacidade da dupla camada	F
e	carga do elétron	C
E	campo elétrico	$V\ m^{-1}$
E	potencial do eletrodo	V
	E^{θ} potencial formal	
	E_p potencial de pico	
	ΔE_s degrau de potencial	
E_F	energia de Fermi	eV
E_{redox}	energia do par redox	eV
f	frequência	Hz
	f_0 frequência fundamental do cristal de quartzo	
I	corrente elétrica	A
	I_b corrente inversa (<i>backward current</i>)	
	I_C corrente capacitiva	
	I_f corrente faradaica	
	I_f corrente direta (<i>forward current</i>)	
	I_p corrente de pico	
	I_t corrente total	
k	constante de velocidade homogênea	$m\ s^{-1}$
	k_0 constante de velocidade padrão	
	k_a constante de velocidade de oxidação	
	k_a constante de velocidade de redução	
n	número de elétrons transferidos	—
Q	carga elétrica	C
Q	elemento de fase constante	F
R	resistência	Ω
	R_{ct} resistência à transferência de carga	
	R_{Ω} resistência da solução numa célula	

t	tempo	s
T	temperatura	K
$W_{1/2}$	largura a meia-altura do pico	mV
X	reactância	Ω
Z	impedância	Ω
	Z' parte real da Z	
	Z'' parte imaginária da Z	
α	coeficiente de transferência de carga	—
α	parâmetro da rugosidade do eléctrodo	—
Γ	concentração da espécie adsorvida	mol m ⁻²
θ	$\exp[(nF/RT)(E - E^0)]$	
μ	Modo de cisalhamento do cristal de quartzo	g cm ⁻¹ s ⁻¹
ρ	densidade do cristal de quartzo	g cm ⁻³
σ	$\nu(nF/RT)$	—
ν	velocidade de varrimento	V
λ	comprimento de onda	nm
Φ	diâmetro	m
φ	ângulo de fase	
ω	frequência radial	rad s ⁻¹

Subscritos

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

Abreviaturas

ApoCaM	apocalmodulina
CaM	calmodulina
CAV-1	caveolina 1
CAV-2	caveolina 2
CAV-3	caveolina 3
Cys	cisteína
DP	impulso diferencial
DTT	ditiotreitól
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
GCE	elétrodo de carbono vítreo
GuaHCl	Hidrocloreto de guanidina
His	histidina
HoloCaM	holocalmodulina
ISA	isatina
Met	metionina
QCM	balança de cristal de quartzo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SW	onda quadrada
TCEP	tris-(2-carboxietil)-fosfina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina

Constantes físicas fundamentais

e	unidade de carga elétrica	$1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$
F	constante de Faraday	$9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
k_B	constante de Boltzman	$1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
R	constante dos gases ideais	$8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
N_A	constante de Avogadro	$6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Introdução

A saúde é um bem precioso para a humanidade. Em todo o mundo, milhões de pessoas vêm a sua saúde afetada por várias condições patológicas, tais como doenças infectocontagiosas, distúrbios neurológicos como a doença de *Parkinson* e de *Alzheimer*, doenças crónicas como a diabetes e a hipertensão, doenças cardiovasculares, e cancro que é das doenças que mais receio provoca na sociedade, por lhe estar associado um elevado nível de mortalidade e tratamentos muito dolorosos. Infelizmente, a nível mundial verifica-se um aumento de incidência deste tipo de doenças, assim como o aparecimento de novos casos de cancro e de doenças para as quais não existe tratamento e, como resultado, apenas se pode atuar no sentido de minimizar os seus sintomas, melhorando assim a qualidade de vida do doente.

De um modo geral, um medicamento (fármaco) é qualquer substância química que afeta o organismo e a sua estrutura, uma vez que é capaz de provocar alterações nas funções biológicas através de ações químicas. De acordo com a legislação portuguesa, nomeadamente o Decreto-Lei 176/2006 de 30 de agosto, “medicamento é toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas, que possa

ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um tratamento médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” [1].

O processo global de desenvolvimento de novos fármacos envolve uma investigação, que consiste em identificar a substância química inicial com um determinado perfil, seguido da demonstração da sua eficácia e segurança antes da introdução no mercado. Todo este processo envolve o esforço de uma equipa multidisciplinar de investigadores de diversas áreas.

Uma substância química para ter interesse farmacêutico deve obedecer a determinadas características que lhe permitam ligar-se a um determinado alvo e atingir o efeito desejado. Muitos outros fatores também devem ser levados em consideração, entre eles, a atividade da molécula *in vivo*, a estereoquímica, difusão, solubilidade, metabolismo, as transferências de próton e as reações redox envolvidas nos processos fisiológicos. Estas últimas desempenham um papel fundamental porque uma grande parte dos fenómenos biológicos, fundamentais no desenvolvimento e na manutenção da vida, correspondem a processos metabólicos e fisiológicos que envolvem a separação e a transferência de carga. Entre as reações químicas que ocorrem nos seres vivos com transferência de próton e redox fazem parte por exemplo, as reações de produção de energia necessária para a preservação da vida.

A eletroquímica tem a vantagem de permitir determinações quantitativas de analitos diretamente na amostra, sem necessidade de tratamento ou separação química e, em situações em que os efeitos de matriz são reduzidos. Além disso, a utilização dos métodos voltamétricos permite a determinação e deteção rápida e simultânea de compostos farmacêuticos, com custos reduzidos, procurando evitar o uso de solventes orgânicos, aspetos muito importantes atualmente em qualquer análise [2–7]. A

investigação dos processos de transferência de elétrons em reações biológicas, fornecida por dados eletroquímicos e correlacionados com a estrutura-atividade da molécula, pode fornecer informações úteis sobre os mecanismos que ocorrem nas células vivas [8–10].

O trabalho desenvolvido insere-se neste contexto, pois tem como objetivo a investigação do comportamento redox e dos mecanismos de oxidação e redução de vários compostos indólicos e das proteínas membranares calmodulina e caveolinas.

Na primeira parte do trabalho foi investigado o comportamento eletroquímico e os respectivos mecanismos de oxidação e redução de vários compostos indólicos derivados da isatina (ISA), que possuem um amplo perfil farmacológico. Os compostos em estudo foram separados em três grupos distintos em função dos grupos funcionais que se encontram ligados à ISA.

Na segunda parte foi investigado o comportamento eletroquímico da proteína calmodulina e a sua interação com o cálcio, e das proteínas caveolina 1, caveolina 2 e caveolina 3, e a sua interação com o colesterol.

Este sistema está de certo modo interligado, uma vez que a calmodulina é também uma proteína de ligação da isatina. O perfil farmacológico dos derivados da isatina poderá eventualmente ter efeito sobre os mecanismos de ação dos sistemas biológicos onde a calmodulina está implicada. Ainda, nas células endoteliais, a caveolina 1 interage com a enzima eNOS, de forma a inibir a sua atividade, sendo que a libertação e ativação da enzima ocorre devido à sua interação com a calmodulina na sua forma saturada de cálcio.

Apresenta-se a seguir uma descrição das propriedades farmacoterapêuticas, físico-químicas e eletroquímicas de todos os compostos estudados, uma breve descrição dos aminoácidos e das proteínas; assim como dos princípios básicos da eletroquímica e de todas as técnicas utilizadas no decorrer do trabalho experimental.

1.2 Compostos aromáticos: indol

A primeira parte deste trabalho incide no estudo do comportamento eletroquímico de três grupos de compostos aromáticos derivados da isatina, um importante derivado do indol, descritos nos capítulos 3, 4 e 5, e que apresentam várias propriedades farmacoterapêuticas.

Os indóis representam uma família de compostos aromáticos que se encontram presentes predominantemente em plantas, animais e como metabolitos de bactérias e fungos [11].

O indol, **Figura 1.1**, tem como estrutura base um composto orgânico aromático com uma estrutura bicíclica, que resulta da fusão do anel benzeno nas posições C2 e C3 do anel pirrol [12,13]. Estes compostos possuem um importante sistema de anéis heterocíclicos que faz com que os seus derivados sejam alvo de especial interesse nas áreas tanto da química biológica como na área da química medicinal.

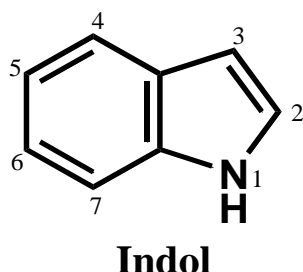


Figura 1.1 Estrutura química do indol.

O indol pode apresentar substituições nas diferentes posições do anel indólico, no entanto, devido às características do anel pirrol, sofre substituição aromática eletrofílica preferencial na posição C3 [12,14]. Como exemplos de indóis substituídos temos: o **triptofano** (aminoácido essencial para os seres humanos, uma vez que está presente na maioria das proteínas), a **melatonina** e o **5-metoxitriptofol** (hormonas segregadas pela glândula pineal), a **serotonina** (neurotransmissor sintetizado no

organismo) e o **ácido indol-3-acético** (hormona importante presente nas plantas) [15]. Na verdade, são muitos os derivados do indol que são fundamentais em diversos processos biológicos e microbiológicos.

O indol também é um importante núcleo biologicamente ativo, que faz parte da estrutura de vários compostos farmacêuticos, agroquímicos e alcalóides. Os estudos farmacológicos efetuados demonstram que os compostos indólicos possuem uma grande variedade de atividades biológicas [16,17], entre as quais anti-inflamatórias [18–20], analgésicas [19], antibacterianas [21], anticancerígenas [22,23], neuroprotetivas [24] e antioxidantes [15,25,26]. Devido às suas propriedades, o indol é uma estrutura de elevado interesse na química medicinal moderna, sendo utilizado no desenvolvimento de novos fármacos, com maior atividade e efeitos secundários mínimos.

Os compostos indólicos podem sofrer oxidação eletroquímica através de vários mecanismos. O comportamento eletroquímico do indol e de alguns derivados já foi investigado em meio aquoso e utilizando diversos materiais de eletrodo [27–31].

1.2.1 Isatina

A isatina (2,3-dioxindol, ISA), **Figura 1.2**, é um composto heterocíclico que possui na sua estrutura o núcleo indólico. A molécula possui vários centros reativos o que faz com que tanto a ISA como os seus derivados participem num elevado número de reações de síntese orgânica [32], sendo frequentemente utilizados como substrato na síntese de uma enorme variedade de derivados que possuem um amplo perfil farmacológico [33–35]. As reações de síntese incluem substituições eletrofílicas aromáticas nas posições C5, C6 e C7, reações de alquilação e acilação no nitrogénio, adições nucleofílicas no grupo carbonil C3, oxidações e reduções quimiosseletivas, e reações de *Mannich* e *Michael*, entre outras [32,35].

A isatina é um derivado metabólico da adrenalina e por isso está presente em diferentes regiões do cérebro, tecidos e fluidos humanos [36]. A sua distribuição no cérebro é específica e descontínua, podendo alcançar concentrações máximas de 1µM encontradas no hipocampo e no cerebelo [37]. Também se encontra distribuída na natureza em algumas plantas do género *Isatis*, por exemplo, nas espécies *Calanthe discolor* Lindl. e *Couropita guianensis* Aubl. e ainda na secreção da glândula parótida de sapos do género *Bufo* [37,38].

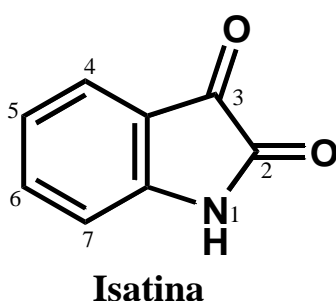


Figura 1.2 Estrutura química da isatina (ISA).

A isatina é uma molécula muito importante pelas suas propriedades biológicas e farmacológicas, em particular as propriedades antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante e anti-inflamatória [33,39]. Entre as várias funções da ISA, a função de modulador em diferentes processos bioquímicos tem servido de base a inúmeros estudos na última década.

Inicialmente, a isatina foi identificada como um agente inibidor endógeno da enzima monoamina oxidase (MAO) [40] e, mais tarde, como inibidor específico da MAO B [41,42], e também da atividade do recetor guanilato ciclase, que é estimulada pelo peptídeo atrial natriurético [43] e pelo óxido nítrico [36]. Para concentrações superiores serve de inibidor de várias enzimas, e em doses elevadas (80 mg kg⁻¹) provoca efeito sedativo e anticonvulsivo [39].

A isatina interage de maneira reversível com um grande número de alvos biológicos conhecidos, entre os quais várias proteínas vitais para as células. Esta característica pode influenciar o modo de interação das proteínas de ligação com as estruturas citoesqueléticas, um fator que é determinante tanto na manifestação como na atenuação das doenças neurodegenerativas [44]. Estudos revelaram concentrações elevadas de isatina nas regiões do hipocampo e no córtex, que são normalmente afetadas pela deposição de péptidos beta amiloides (A β), característica da doença de *Alzheimer*, ou seja, parece existir uma relação entre a ISA e os péptidos A β que ainda não está bem definida [44]. O núcleo da isatina tem sido muito usado no desenvolvimento de compostos que atuam como inibidores da apoptose, anticonvulsivos e ansiolíticos [44].

O comportamento eletroquímico da isatina foi investigado em meio aquoso com o GCE [27] e com o elétrodo de mercúrio [45,46]. Apesar da importância da ISA o comportamento eletroquímico e os mecanismos redox dos derivados da ISA não se encontram bem clarificados.

1.2.1.1 Derivados nitrogenados da isatina

O grupo de derivados nitrogenados da isatina inclui todos os derivados que possuem na sua estrutura um ou mais átomos de nitrogénio, nomeadamente os grupos funcionais nitro, hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona.

Os derivados da isatina que possuem o grupo funcional hidrazona, **Figura 1.3**, do qual fazem parte a isatina-3-hidrazona e a 7-metil-isatina-3-hidrazona, pertencem ao grupo de compostos chamados de hidrazonas. Este grupo funcional permitiu desenvolver uma importante classe de novas moléculas que possuem atividade antimicrobiana [47,48], anticonvulsivo [49,50], analgésica [50], anti-inflamatória [50], antituberculosa e anticancerígena [48,51,52].

Um estudo recente indicou que os derivados da isatina-3-arilhidrazona atuam como inibidores da agregação de péptidos A β impedindo a formação de placas amiloides fibrilares no meio extracelular do cérebro, muito características das doenças neurodegenerativas [53].



Figura 1.3 Estruturas químicas de derivados da isatina com o grupo funcional hidrazona.

Os derivados da isatina com os grupos funcionais semicarbazona e tiosemicarbazona, **Figura 1.4**, apresentam um amplo perfil farmacológico que inclui atividade antitumoral, antiviral, antifúngicas e antibacteriana [54,55].

De um modo geral, as semicarbazonas e as tiosemicarbazonas atuam através da inibição de enzimas ou estabelecem interações com DNA e inibição da síntese do DNA [54]. Em particular, as tiossemicarbazonas apresentam elevada afinidade para a enzima ribonucleotídeo redutase, que interfere diretamente na síntese do DNA e, conseqüentemente, com a divisão celular [56,57]. A sua atividade biológica também está atribuída à capacidade de formar complexos do tipo quelatos, onde as tiosemicarbazonas atuam como ligantes ao doar pares de elétrons aos íons metálicos [54,55]. As isatinas- β -tiossemicarbazonas são moléculas relevantes no combate a tumores que desenvolvem resistência múltipla aos fármacos e são alvo de inúmeros estudos na tentativa da descoberta de novos medicamentos [58].

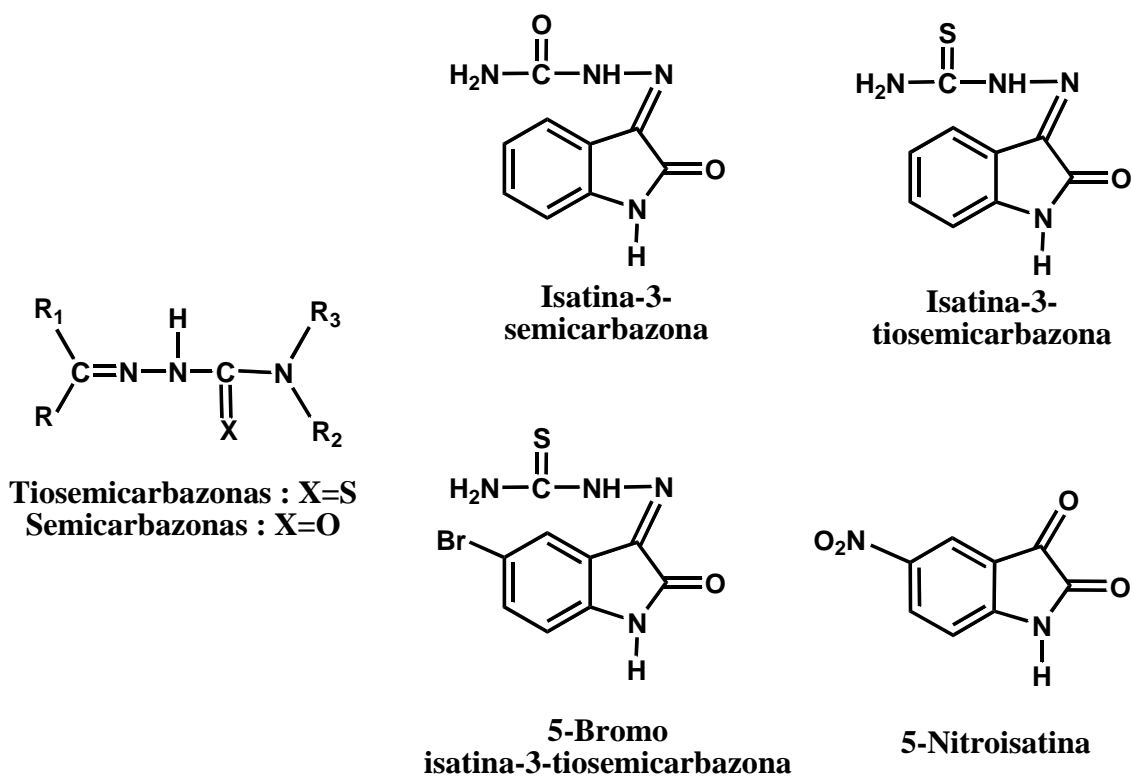


Figura 1.4 Estruturas químicas de derivados da isatina com os grupos funcionais semicarbazonas e tiosemicarbazonas.

Os derivados da isatina-3-tiosemicarbazona, entre os quais, a isatina-3-semicarbazona, a isatina-3-tiosemicarbazona, a 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona e a 5-nitroisatina e os seus complexos metálicos possuem atividade anticancerígena [59,60], são agentes antibacterianos, antivirais [61], antifúngicos, antituberculose [62] e anti-HIV [63], atividades biológicas comuns com a ISA e com o composto indol. Alguns compostos aromáticos que contêm na sua estrutura o grupo nitro são frequentemente utilizados como agentes quimioterapêuticos, cardiovasculares e também como anticonvulsivas [64,65].

1.2.1.2 Derivados halogenados da isatina

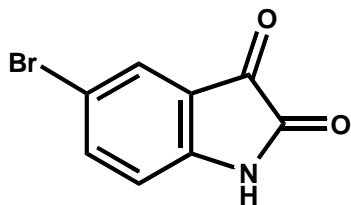
Os derivados halogenados da isatina estudados possuem na sua estrutura um ou mais átomos de halogéneo (Cl, F, Br, I), **Figura 1.5**. Também estes são considerados moléculas bioativas muito promissoras, utilizadas frequentemente na síntese de

substâncias químicas com vista ao desenvolvimento de novos compostos com interesse farmacêutico [64–72].

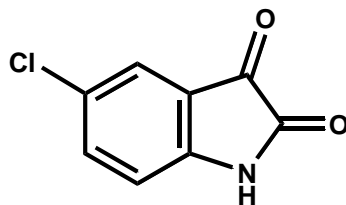
Os derivados da isatina que possuem flúor na sua estrutura serviram de base para a síntese de compostos classificados de agentes citotóxicos por apresentarem atividade antibacteriana contra quatro tipos de bactérias *Gram-positivas* e três tipos *Gram-negativas* e atividade antifúngica contra dois tipos de fungos [70].

Um dos derivados mais interessantes é a 5-flúor-isatina que é o precursor do fármaco Sunitinib, aprovado em 2006 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do carcinoma das células renais, de tumores de estroma gastrointestinais e de tumores neuroendócrinos pancreáticos [73,74]. O Sunitinib atua através da inibição de proteínas, em particular das proteínas tirosina quinase que estão envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese), vitais para o crescimento rápido de tumores, progressão e desenvolvimento das metástases [75,76]. Atualmente, já existem compostos análogos ao Sunitinib, com 5-flúor, 5-cloro e 5-bromo, cuja citotoxicidade é idêntica ao fármaco Sunitinib [77]. O derivado 5-flúor-isatina também foi utilizado na síntese de uma série de compostos, alguns dos quais apresentaram atividade antituberculosa, verificada através da inibição completa da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* [78].

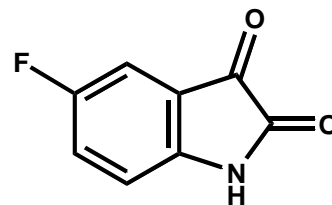
A síntese de vários compostos com os substituintes cloro, flúor e bromo foi efetuada, e verificou-se que apesar de todos os compostos obtidos apresentarem atividade anticonvulsante, a presença do átomo de flúor induz uma maior contribuição, seguida do átomo de cloro [79]. Relativamente aos derivados com os átomos de bromo e de cloro, encontram-se na literatura diversos artigos de revisão que atestam as suas propriedades farmacoterapêuticas [80–82].



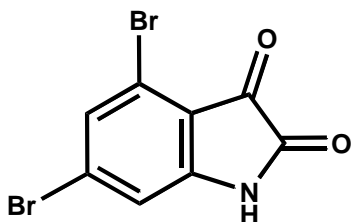
5-Bromo-isatina



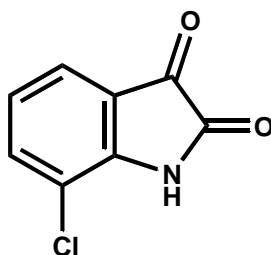
5-Chloro-isatina



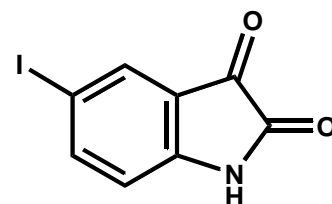
5-Flúor-isatina



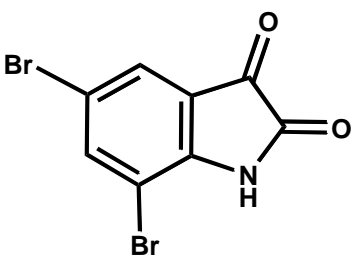
4,6-diBromo-isatina



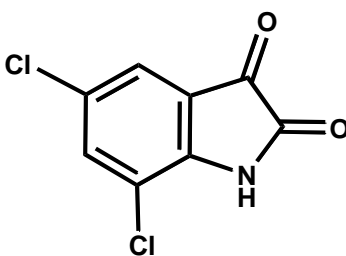
7-Chloro-isatina



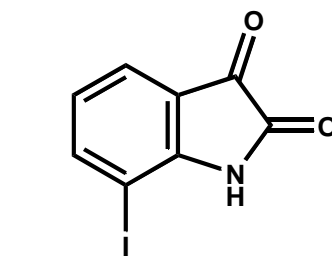
5-Iodo-isatina



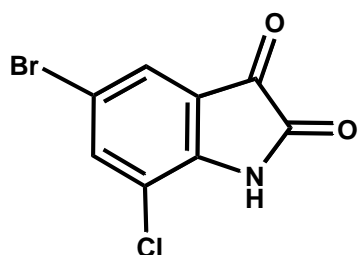
5,7-diBromo-isatina



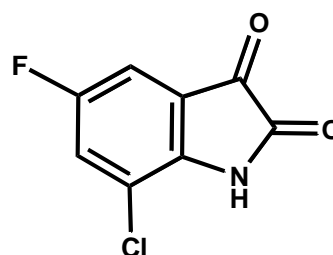
5,7-diCloro-isatina



7-Iodo-isatina



5,7-Bromo-cloro-isatina



5,7-Flúor-cloro-isatina

Figura 1.5 Estruturas químicas de derivados da isatina com átomos de halogéneo.

As bases de *Shiff* e *N-Mannich* obtidas a partir dos derivados com os átomos na posição C5 apresentam atividade antifúngica e antibacteriana, no entanto, aqueles que possuem o átomo de bromo são os que apresentam melhores resultados relativamente à atividade antibacteriana [82].

Estes derivados são também relevantes devido às suas propriedades citotóxicas e antineoplásicas [64,72], como é o caso dos derivados com bromo nas posições C5, C6 e C7, alguns dos quais com mais do que um átomo de halogéneo no anel benzeno, aspeto que parece influenciar positivamente a atividade anticancerígena da molécula [65].

A relação estabelecida entre a estrutura da molécula e a sua atividade determina que as moléculas substituídas nas posições C5, C6 e C7, com um ou mais átomos de halogéneo, apresentam melhores resultados em comparação com a ISA. No entanto, quando o átomo se encontra na posição C5, a molécula apresenta melhores resultados relativamente à atividade farmacoterapêutica, sendo esta posição considerada a mais favorável para a substituição de halogéneos uma vez que está associada a um aumento generalizado da atividade biológica não só na ISA e derivados mas num grande número de compostos indólicos. A substituição na posição C5 por átomos mais eletronegativos, como é o caso do cloro e do bromo, aumenta a lipofilicidade das moléculas e melhora a citotoxicidade das mesmas [35,65].

Uma vez que os derivados halogenados são muitas vezes aplicados na síntese de moléculas bioativas com interesse farmacêutico comprovado, torna-se importante investigar o comportamento redox *in vitro*, com o objetivo de prever as reações redox que poderão ocorrer *in vivo*.

1.2.1.3 Derivados da isatina com os substituintes morfolino, hidroximetil e metil

Neste grupo estão incluídos os restantes derivados da isatina, a maioria com o grupo substituinte na posição C1, ligado ao nitrogénio. Dele fazem parte os compostos

que possuem na sua estrutura os grupos substituintes morfolina, representados na **Figura 1.6**, e os compostos com os grupos funcionais hidroximetil e metil, **Figura 1.7**. Alguns derivados também possuem os átomos de halogéneo cloro, bromo, fluor e iodo nas posições C5 ou C6.

As moléculas formadas por derivatização do nitrogénio, com reações de substituição do tipo arilação, alquilação ou acilação, são frequentemente usadas como intermediários ou precursores na preparação de uma grande variedade de compostos heterocíclicos bioactivos [35,65].

O anel de morfolina, **Figura 1.6**, e os seus derivados pertencem a uma classe de compostos de elevado interesse, uma vez que são aplicados em diversas áreas, entre as quais a indústria têxtil, agricultura e farmacêutica. Os derivados da morfolina são frequentemente utilizados na indústria farmacêutica devido às propriedades farmacocinéticas que conferem às moléculas desenvolvidas [83].

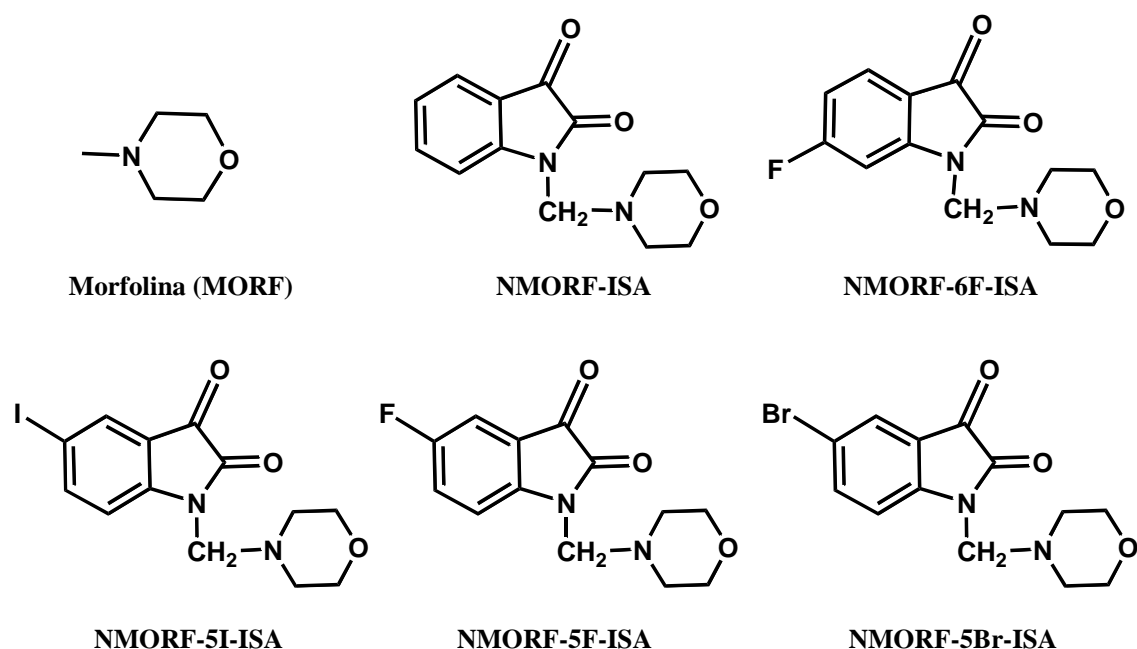


Figura 1.6 Estruturas químicas de derivados da isatina com o grupo funcional morfolina.

As bases de Schiff e Mannich derivadas da ISA que possuem o substituinte morfolina na posição C1 apresentam atividade antibacteriana, antifúngica [84] e propriedades anticancerígenas [65,85]. Este tipo de moléculas possui características quelantes, que permitem formar complexos metálicos com propriedades citotóxicas, no entanto a estrutura dos ligandos, dos metais complexos e do tipo de íon metálico influencia a atividade biológica das moléculas [86].

A morfolina faz parte da estrutura dos morfolinos, análogos sintéticos do DNA, constituídos por bases de DNA convencionais distribuídas ao longo de uma estrutura principal não carregada de anéis de morfolina ligados por grupos fosfordiamidatos [87]. Estes análogos permitem redesenhar a especificidade e afinidade de hibridização com DNA natural ou RNA e são utilizados para aplicações em diagnóstico, em tecnologias de hibridização à superfície [88–90], por exemplo em biossensores e microchips de DNA mas com morfolino imobilizado na superfície, e como agentes inibidores da expressão de determinados genes [87].

Os derivados de metilisatina, **Figura 1.7**, estão a ser utilizados no desenvolvimento de moléculas com propriedades anticonvulsivas, e neste caso, o grupo metilo permitiu aumentar a lipofilicidade das moléculas desenvolvidas [81].

Nos últimos anos a química do indol, e mais propriamente da ISA e derivados, tem recebido muita atenção devido às aplicações clínicas e sintéticas dos compostos. A versatilidade das moléculas e as suas propriedades biológicas e farmacológicas aumentam o interesse nos seus derivados, no entanto, apesar dos estudos realizados e da sua importância, pouco se sabe relativamente ao mecanismo redox destes compostos. Existem alguns estudos na literatura acerca do comportamento eletroquímico da ISA e de alguns derivados, tanto em meio aquoso como em meio não aquoso, recorrendo à voltametria cíclica com eléctrodos de carbono vítreo e de mercúrio [27,45,46].

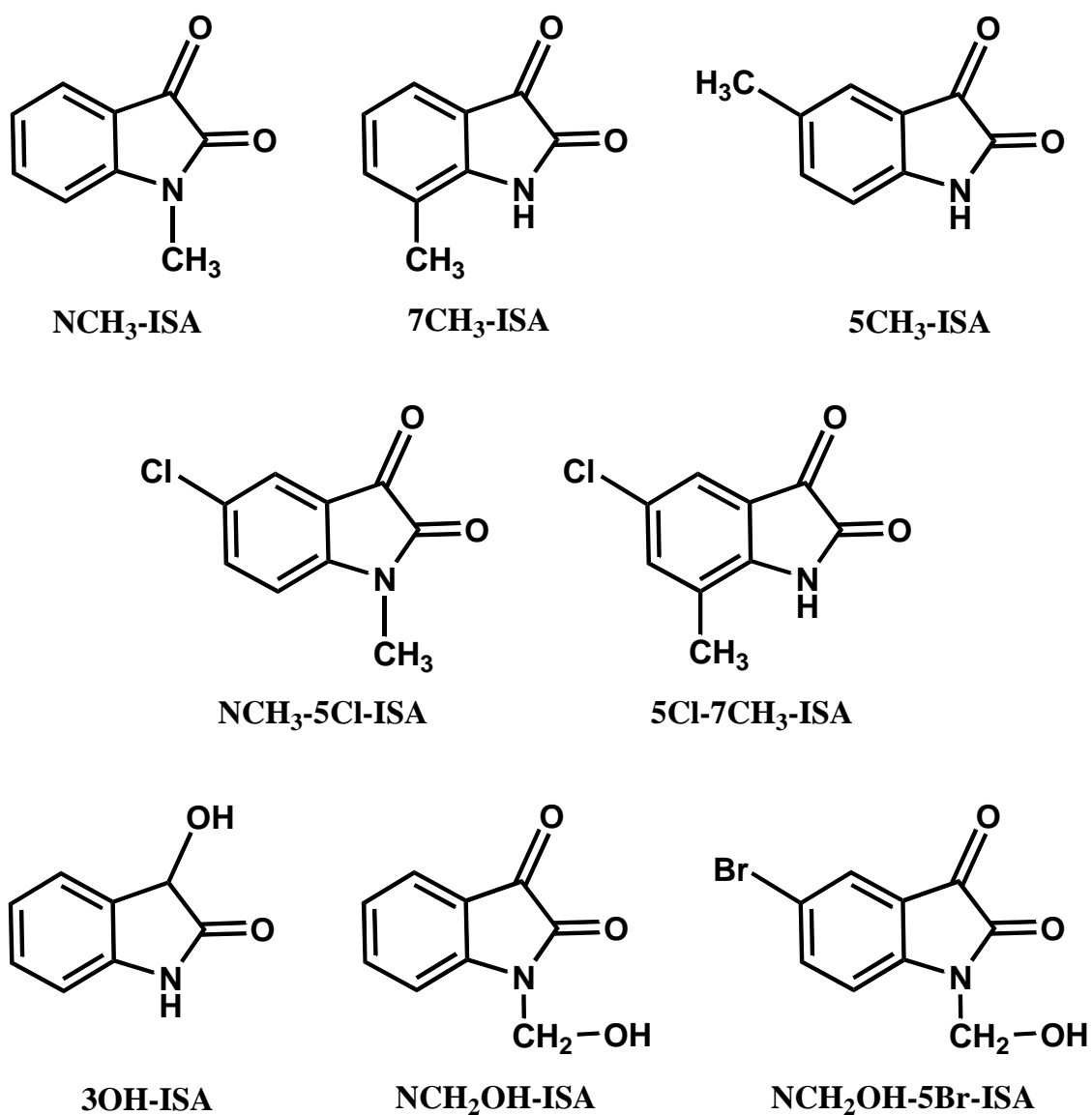


Figura 1.7 Estruturas químicas de derivados da isatina com os grupos funcionais metil e hidroxilo

Neste trabalho foi investigado o comportamento eletroquímico de todos os derivados da isatina e foi avaliada a influência dos grupos funcionais [91–93]. Os resultados do comportamento eletroquímico e os mecanismos de oxidação e redução das moléculas foram apresentados nos *Capítulos 3, 4 e 5*.

1.3 Proteínas

As proteínas são componentes celulares muito importantes nos sistemas biológicos pois estão envolvidas em funções essenciais para os organismos vivos, sendo as moléculas biológicas com a maior variedade de formas e funções. A segunda parte deste trabalho teve como objetivo estudar as propriedades eletroquímicas de proteínas que não contém cofatores redox.

Uma vez que as proteínas são constituídas por aminoácidos, para entender as suas propriedades torna-se necessário fazer uma breve descrição da estrutura dos aminoácidos e das respectivas propriedades físico-químicas e eletroquímicas.

1.3.1 Estrutura e propriedades dos aminoácidos.

Os aminoácidos estão entre os componentes mais importantes dos organismos vivos. São moléculas derivadas de ácidos orgânicos cuja estrutura geral é constituída por um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral R, de dimensões e características variáveis, ligadas a um carbono central saturado ($C\alpha$), **Figura 1.8** e **Tabela 1.1**. Na natureza existem centenas de aminoácidos diferentes, dos quais apenas 20 aminoácidos fazem parte da composição das proteínas. Estes são denominados de α -aminoácidos porque, à exceção da prolina, **Tabela 1.1**, todos têm os grupos amina e ácido carboxílico substituídos no mesmo carbono α .

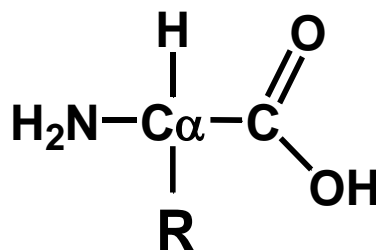
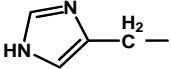
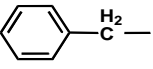
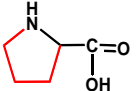
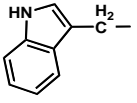
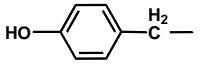


Figura 1.8 Estrutura geral dos aminoácidos.

Tabela 1.1 Estrutura e propriedades químicas dos α -aminoácidos.

Aminoácido (Abreviatura) [96]	Cadeia lateral	Polaridade da cadeia lateral	Carga da cadeia lateral (pH = 7,00)	Índice de hidropaticidade [97]
Alanina Ala (A)	$\text{H}_3\text{C}-$	apolar	Neutra	1,8
Arginina Arg (R)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Positiva	-1,4
Asparagina Asn (N)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Neutra	-3,5
Ác. Aspártico Asp (D)	$\text{HO}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Negativa	-3,5
Ác. Glutâmico Glu (E)	$\text{HO}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Negativa	-3,5
Cisteína Cys (C)	$\text{HS}-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	Neutra	2,5
Glutamina Gln (Q)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Neutra	-3,5
Glicina Gly (G)	$\text{H}-$	apolar	Neutra	-0,4
Histidina His (H)		polar	Neutra	-3,2
Isoleucina Ile (I)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)-$	apolar	Neutra	4,5
Leucina Leu (L)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	Neutra	3,8
Lisina Lys (K)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Positiva	-3,9
Metionina Met (M)	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_2)-$	apolar	Neutra	1,9
Fenilalanina Phe (F)		apolar	Neutra	2,8
Prolina Pro (P)		apolar	Neutra	-1,6
Serina Ser (S)	$\text{HO}-\text{C}(\text{H}_2)-$	polar	Neutra	-0,8
Treonina Thr (T)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H})(\text{OH})-$	polar	Neutra	-0,7
Triptofano Trp (W)		apolar	Neutra	-0,9
Tirosina Tyr (Y)		polar	Neutra	-1,3
Valina Val (V)	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)-$	apolar	Neutra	4,2

Todos os α -aminoácidos contêm carbono, hidrogénio, azoto e oxigénio, no entanto existem dois, a metionina e a cisteína, que também contêm enxofre **Tabela 1.1** [94,95].

Os α -aminoácidos partilham com outros monómeros bioquímicos uma propriedade essencial que lhes permite formar polímeros, ou seja, os grupos NH_3^+ e COO^- que podem reagir com outros grupos e formar ligações covalentes.

No caso da formação de proteínas ocorrem ligações peptídicas entre vários aminoácidos, na qual o grupo amina de uma das moléculas reage com o grupo carboxilo da outra resultando na eliminação de uma molécula de água e na formação de um polipéptido [94].

O comportamento ácido-base dos aminoácidos é importante porque influencia a sua reatividade e, conseqüentemente também influencia as propriedades das proteínas. Além disso, o método de identificação dos diferentes aminoácidos vai depender das propriedades ácido-base de cada aminoácido [94].

Em condições de $\text{pH} = 7,0$ os grupos carboxilo e amina encontram-se carregados mas, no intervalo de pH de 1 a 14 estes grupos apresentam uma série de equilíbrios que envolvem reações de ligação ou dissociação de um protão.

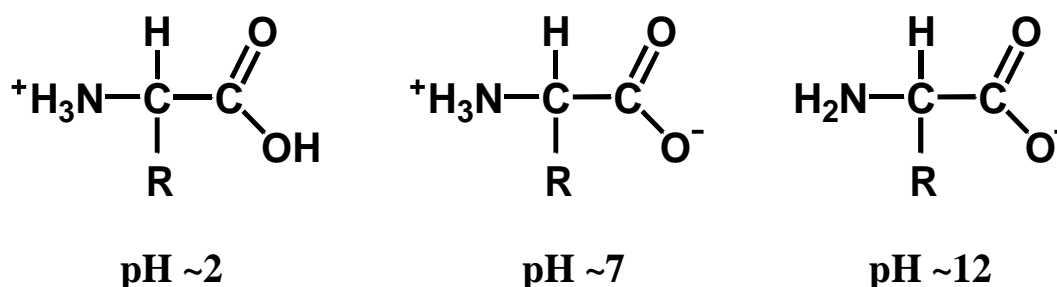


Figura 1.9 Estruturas principais dos aminoácidos em função do valor de pH .

Para pH ~ 2,0 ocorre a ligação de um próton que neutraliza a carga do grupo carboxilo, enquanto que para pH ~ 12 ocorre a dissociação de um próton do grupo carboxilo, neutralizando-se o grupo amina. As estruturas de ionização dos aminoácidos em função do pH estão representadas na **Figura 1.9**.

Para ambas as situações, ocorre a ionização dos grupos carboxilo e amina, no qual o grupo doador de prótons é -COOH ou -NH₃⁺, e o grupo aceitador de prótons é -COO⁻ ou -NH₂ [94]. A extensão da ionização depende da constante de equilíbrio da reação.

Na **Tabela 1.2** são apresentados os valores do pK₁, do pK₂ e do pK_R, para os 20 α-aminoácidos, referindo-se aos grupos ácido carboxílico, amina e ao grupo funcional R, respetivamente.

Os grupos carboxilo com valores de pK₁ ~ 2,2, são ácidos fracos, e para pH > 3,5 estes grupos encontram-se na forma de carboxilatos. Os grupos amina com valores de pK₂ ~ 9,4 são bases fracas, e para pH < 8,0 os aminoácidos encontram-se na forma de iões amónia. No intervalo de pH fisiológico, ambos os grupos carboxílico e amina encontram-se completamente ionizados, na forma de iões dipolares ou *zwitterions*, **Figura 1.9**. Os aminoácidos são substâncias anfotéricas, podendo atuar como ácido ou como base [95].

A cadeia lateral R é responsável pelas diferentes propriedades de cada um dos aminoácidos e também pode conter grupos funcionais com características de doador ou aceitador de prótons, como é o caso dos aminoácidos arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, cisteína, histidina e tirosina, que nestes casos envolve um pK_R adicional [94]. Uma vez que as proteínas são constituídas por aminoácidos, as propriedades dos grupos da cadeia lateral R contribuem consideravelmente para as propriedades físico-químicas das proteínas.

Tabela 1.2 Valores de pK_1 , pK_2 e pK_R dos α -aminoácidos [95].

Aminoácidos	pK_1 (α -COOH)	pK_2 (α -NH ₃ ⁺)	pK_R
Alanina	2,35	9,87	-
Arginina	1,82	8,99	12,48
Asparagina	2,14	8,72	-
Ác. Aspártico	1,99	9,90	3,90
Ác. Glutâmico	2,10	9,47	4,07
Cisteína	1,92	10,70	8,37
Glutamina	2,17	9,13	-
Glicina	2,35	9,78	-
Histidina	1,80	9,33	6,04
Isoleucina	2,32	9,76	-
Leucina	2,33	9,74	-
Lisina	2,16	9,06	10,54
Metionina	2,13	9,28	-
Fenilalanina	2,20	9,31	-
Prolina	1,95	10,64	-
Serina	2,19	9,21	-
Treonina	2,09	9,10	-
Triptofano	2,46	9,41	-
Tirosina	2,20	9,21	10,46
Valina	2,29	9,74	-

Tendo em conta as estruturas da cadeia lateral R, **Tabela 1.1**, as principais diferenças observadas verificam-se em relação ao tamanho, à carga e à hidrofobicidade dos aminoácidos [94]. Os aminoácidos encontram-se divididos em classes de acordo com as características químicas do grupo R. Sendo assim, de acordo com a polaridade da cadeia lateral temos três classes distintas de aminoácidos que são: (a) os que possuem

grupos R não polares, (b) os que possuem grupos R polares não carregados e (c) os que possuem grupos R polares carregados [95].

A classe dos aminoácidos não polares incluiu a Glicina, o aminoácido mais pequeno ($R = H$), alanina, valina, leucina e isoleucina, com grupos alquila de tamanhos diferentes e com características hidrofóbicas, e metionina, prolina, e triptofano, estes dois últimos com anéis aromáticos e com características hidrofóbicas [95].

A classe dos aminoácidos não polares incluiu a Glicina, o aminoácido mais pequeno ($R = H$), alanina, valina, leucina e isoleucina, com grupos alquila de tamanhos diferentes e com características hidrofóbicas, e metionina, prolina, e triptofano, estes dois últimos com anéis aromáticos e com características hidrofóbicas [95].

A classe dos aminoácidos com cadeias polares não carregadas inclui os aminoácidos serina e treonina, com grupos funcionais hidroxilo, a asparagina e glutamina, com grupos amida substituídos, a tirosina com um grupo fenólico e a cisteína, a única com um grupo tiol substituído [95].

Os aminoácidos com cadeias polares carregadas incluem a lisina, arginina e histidina, que estão carregados positivamente em pH fisiológico, e o ácido aspártico e ácido glutâmico, carregados negativamente para $pH > 3,0$ [95].

Os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano, devido à presença dos anéis aromáticos absorvem na região ultravioleta do espectro eletromagnético, são responsáveis pelas propriedades de absorvância e fluorescência das proteínas. Os restantes aminoácidos absorvem na região dos infravermelhos [94].

Outra característica importante dos aminoácidos está relacionada com o carbono α ($C\alpha$) central, assimétrico e que dá origem a um centro quiral e dois isómeros. À exceção da glicina, todos os aminoácidos são moléculas quirais e podem existir em duas formas diferentes, as configurações absolutas L- ou D-. Todos os aminoácidos

naturais que se encontram nas proteínas pertencem à configuração absoluta L-, à exceção da glicina que não é uma molécula quiral.

1.3.2 Propriedades eletroquímicas dos aminoácidos

O comportamento eletroquímico dos aminoácidos em diferentes materiais de eletrodo já foi estudado e apresentado em vários trabalhos [98–102]. Dos 20 aminoácidos que fazem parte da constituição das proteínas apenas a tirosina [6,103–107], o triptofano [28,103,106,107], a histidina [100,106,108], a cisteína [109,110] e a metionina [100,106,107,111] sofrem oxidação na superfície dos eletrodos de carbono. Os mecanismos de oxidação dos aminoácidos na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) encontram-se esclarecidos na literatura [105–107,112], **Figura 1.10**, **Tabela 1.3**.

Os aminoácidos tirosina e triptofano possuem na cadeia lateral os grupos fenol e indol que podem sofrer oxidação eletroquímica. A oxidação eletroquímica da tirosina em eletrodos de carbono [107] revelou a existência de dois mecanismos de oxidação. O primeiro ocorre quando a concentração à superfície é muito elevada, e verificam-se a formação de polímeros inibidores na superfície do eletrodo, e o segundo ocorre com a oxidação de unidades monoméricas, e neste caso não se verifica a formação de polímeros. Os dois mecanismos de oxidação são dependentes do pH. No caso do triptofano, observa-se um comportamento idêntico uma vez que também ocorre a formação de um polímero inibidor na superfície do eletrodo [107].

A oxidação eletroquímica da tirosina na superfície do eletrodo de carbono vítreo está relacionada com a oxidação do grupo fenol e envolve a formação de um radical fenóxido, estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, que dá origem a um produto de oxidação eletroativo [105].

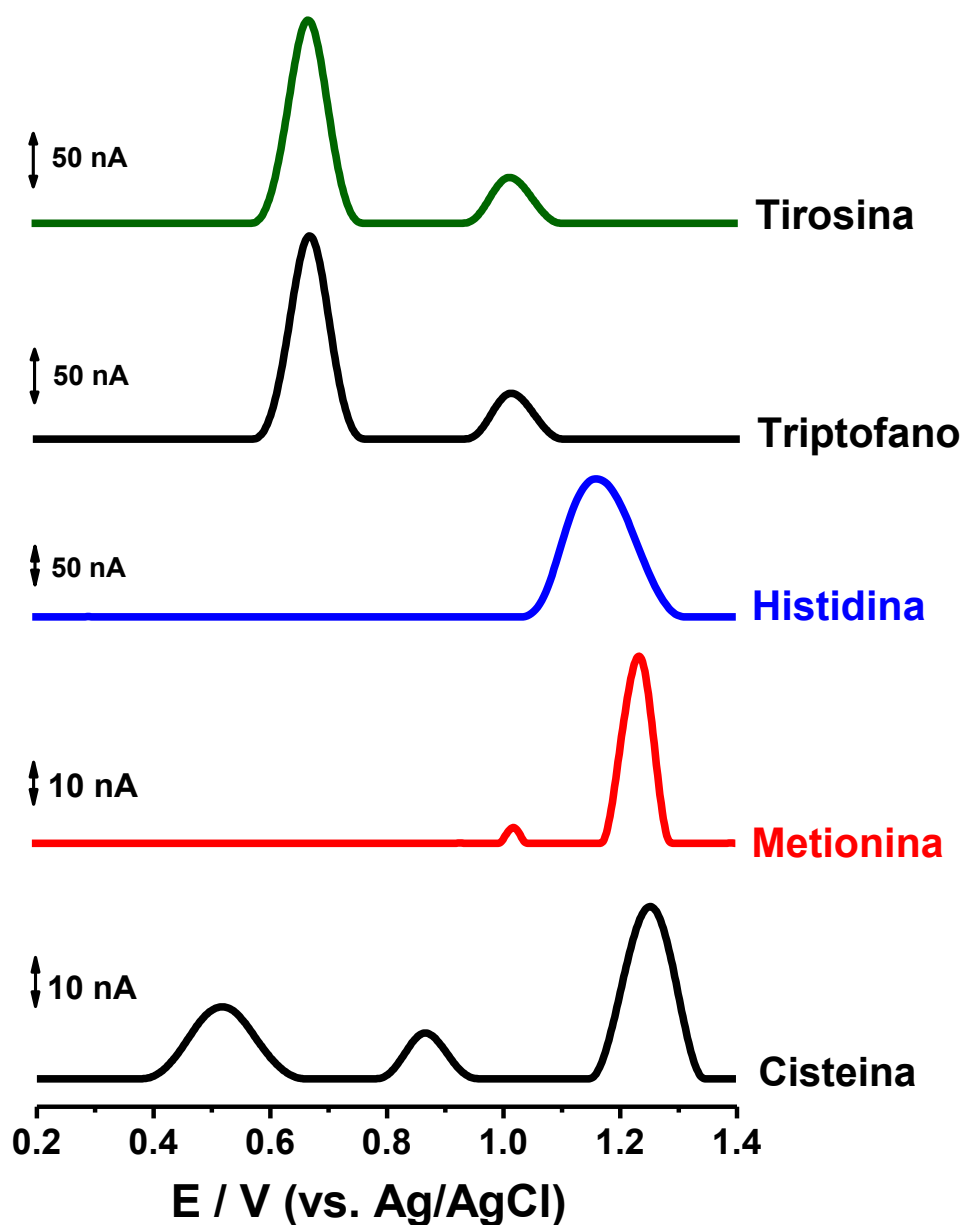


Figura 1.10 Voltamogramas de DP no GCE, com correção da linha de base, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), em soluções de 25 μ M tirosina, 25 μ M triptofano, 50 μ M histidina, 50 μ M metionina e 50 μ M cisteína. [Adaptado de [28,105,106,112]].

Relativamente ao triptofano, a oxidação eletroquímica ocorre em duas etapas e esta relacionada com a oxidação do grupo indol. A primeira etapa corresponde à oxidação do carbono C2 do anel pirrol e de seguida ocorre uma hidroxilação na posição C7 do anel benzeno, com formação de produtos eletroativos fortemente adsorvidos na superfície do eléctrodo, que também são oxidados reversivelmente [28].

Tabela 1.3: Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos, em eletrólito inerte a pH = 7.0 (tampão fosfato em 0.1 M).

Aminoácidos	$E_{pa} / V \text{ vs. Ag/Cl}$			
Tirosina (Tyr)	0,65	-	-	-
Triptofano (Trp)	0,65	-	1,05	-
Histidina (His)	-	-	1,15	-
Cisteína (Cys)	0,52	0,88	-	1,27
Metionina (Met)	-	-	1,12	1,35

A histidina, a cisteína e a metionina sofrem oxidação eletroquímica devido às propriedades eletrônicas das suas cadeias laterais [101,106–108,112] que, no caso da histidina é o grupo imidazol, no caso da cisteína é o grupo tiol, e no caso da metionina é o átomo de enxofre, que sofrem oxidação.

A oxidação da histidina na superfície do eletrodo de carbono vítreo ocorre num único passo irreversível, que envolve a formação de um radical instável, seguido do ataque nucleofílico da água, no qual se forma a 2-oxohistidina [106].

A oxidação da cisteína envolve três reações de oxidação consecutivas na superfície do eletrodo de carbono vítreo. A primeira reação envolve a oxidação do grupo sulfidril e a formação de radicais, seguido do ataque nucleofílico da água, que dá origem a espécies intermediárias, cuja oxidação leva à formação do ácido cisteico. Por outro lado, pode ocorrer a dimerização dos radicais da primeira reação, a cistina, que sofre oxidação para potenciais mais positivos devido à ligação forte covalente da ponte dissulfeto [112].

A oxidação da metionina ocorre em dois passos, levando à formação do sulfóxido metionina e da metionina sulfona, através de várias espécies intermediárias [112].

1.3.3 Estrutura das Proteínas

As proteínas são os maiores componentes celulares dos sistemas vivos e possuem a maior variedade de formas e funções, sendo as biomoléculas que aparecem em maior percentagem nas células. Todas as proteínas são formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas constituídas pelo mesmo grupo de 20 aminoácidos, no entanto, para cada proteína, tanto a composição como a ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica é diferente, o que faz com que exista uma enorme diversidade e complexidade de moléculas, podendo cada uma apresentar múltiplas funcionalidades. As proteínas podem apresentar variações no tamanho, no peso molecular e no número de subunidades (cadeias polipeptídicas) [94].

A polimerização dos 20 aminoácidos em cadeias polipeptídicas ocorre nas células e é catalisada pelos ribossomas. Quimicamente ocorre uma reação de condensação com libertação de uma molécula de água, entre o grupo amina de um dos aminoácidos e o grupo carboxilo do outro [94], **Figura 1.11**. As extremidades da cadeia formada são designadas por “terminal amino” (ou N-terminal) e “terminal carboxílico” (ou C-terminal).

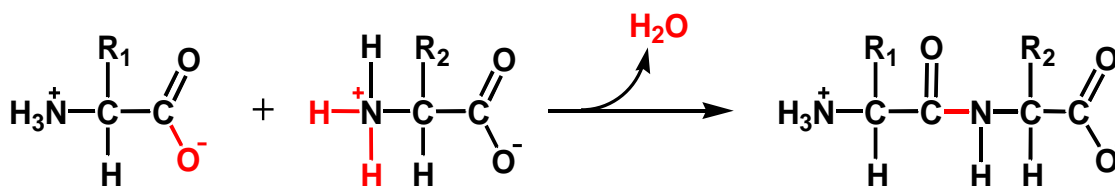


Figura 1.11 Reação de condensação entre dois aminoácidos para formação de um dipéptido [95].

Os aminoácidos nas cadeias peptídicas de aminoácidos ligados em série são denominados de resíduos ou unidades peptídicas, como forma de distinguir os aminoácidos livres e os aminoácidos nas proteínas. Todas as proteínas são constituídas

por resíduos de aminoácidos ligados entre si e com uma sequência gerada através da informação genética.

As proteínas exercem uma grande variedade de funções que se encontram divididas em dois grandes grupos, as funções dinâmicas e as estruturais [94].

As funções dinâmicas das proteínas incluem: (i) a função hormonal, nas quais se incluem proteínas específicas para estimular ou inibir a atividade de alguns órgãos; (ii) a função de defesa do organismo que é efetuada por proteínas denominadas de anticorpos que atuam no combate de infecções bacterianas e virais; (iii) a função enzimática, na qual as proteínas, neste caso as enzimas, funcionam como catalisadores de reações bioquímicas; (iv) a função de transporte e armazenamento de substâncias biológicas importantes, como é o caso da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte do oxigênio no sangue e (v) a função reguladora de diversos processos bioquímicos [94].

As funções estruturais ou citoesqueléticas das proteínas estão relacionadas com a construção de estruturas celulares e histológicas, conferindo resistência aos órgãos e tecidos, como por exemplo a queratina, que está presente no cabelo, unhas e pele [94].

Todas as reações químicas envolvidas nos processos biológicos celulares nomeadamente na expressão genética, na divisão celular, na síntese de novos produtos e secreção de produtos indesejáveis, e até na produção de energia necessária para todos estes processos, ocorrem com interação de proteínas [94,95].

Dada a multiplicidade e a importância das suas funções, não é de estranhar que as proteínas sejam as moléculas mais abundantes na biologia, além da água, e as mais estudadas. O projeto do Mapeamento do Genoma Humano [113] deu origem a uma elevada quantidade de informação que influenciou em grande parte o estudo das várias funções das proteínas [94]. Atualmente existem programas que permitem ver, manipular

e até alterar a representação das proteínas, com o objetivo de entender melhor a sua estrutura e as funcionalidades. A Base de Dados das Proteínas (*Protein DataBank*) permite obter informação relacionada com as sequências e com a estrutura tridimensional de milhares de proteínas distintas e de ácidos nucleicos, bem como de outras moléculas complexas [114]. Apesar de existirem milhares de polipeptídeos, apenas temos conhecimento da estrutura distinta de um pequeno número de proteínas porque muitas delas estão situadas no interior das membranas celulares, tornando difícil a sua caracterização [94].

Uma vez que as proteínas são constituídas por sequências de aminoácidos, as propriedades físico-químicas dos aminoácidos são responsáveis pela reatividade química das proteínas que tem influência direta nas características funcionais e nos seus mecanismos de ação nos organismos vivos. É fundamental entender a sua estrutura e, conseqüentemente as suas propriedades que são determinadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos, e que variam de acordo com a polaridade, a acidez, a aromaticidade, a hidrofobicidade, a flexibilidade conformacional, a capacidade de formar ligações de hidrogénio e a reatividade com outras moléculas [95].

As cadeias laterais das proteínas podem sofrer alterações, ou seja, os aminoácidos podem reagir com grupos químicos mais simples (hidroxilo, metilo, etc.) ou com grupos maiores, que incluem outros aminoácidos através de ligações covalentes e não covalentes. As interações podem ocorrer com lípidos (lipoproteínas), carboidratos (glicoproteínas), ácidos nucleicos, grupos fosfato, iões metálicos (metaloproteínas), grupos heme, etc. Existem no mínimo cerca de 20 elementos da tabela periódica que estão diretamente ligados à estrutura e funcionalidades das proteínas. No caso das metaloproteínas, a ausência do metal pode levar à perda da estrutura e funcionalidade, e impedir o normal funcionamento das células [94,95].

A estrutura das proteínas é um fator fundamental na sua atividade, se a estrutura da proteína for alterada ela pode tornar-se inativa. A desnaturação é o processo de alteração de estrutura da proteína e pode ocorrer devido a temperaturas elevadas, alterações de pH, interação com determinados reagentes químicos, entre outros fatores.

A cadeia polipeptídica é suportada pelas ligações peptídicas covalentes formadas entre os diferentes aminoácidos. Estas ligações apresentam propriedades mistas, das ligações simples C-N e das ligações duplas C=N, traduzindo-se numa ligação com caráter de dupla ligação parcial, rígida e planar. Como consequência desta característica, a ligação peptídica é mais curta do que o esperado para uma ligação simples C-N e o caráter de dupla ligação C=N é o suficiente para impedir a livre rotação [94]. Sendo assim, os átomos tendem a adotar preferencialmente a configuração *trans*, devido ao impedimento estereoquímico entre as cadeias laterais dos resíduos adjacentes. No entanto, para a prolina as duas configurações apresentam energias equivalentes devido à sua estrutura de cadeia cíclica, mesmo assim a configuração *cis* é mais estável e portanto é mais habitual encontrar do que a configuração *trans* [94].

As proteínas possuem estruturas espaciais complexas que podem ser organizadas em quatro níveis de organização estrutural.

A **estrutura primária** das proteínas é dada pela sequência específica de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, pelas ligações peptídicas da molécula e, se existirem, pela localização das pontes dissulfeto. A sequência de aminoácidos nas proteínas é definida pela informação codificada na sequência de nucleotídeos de um gene do DNA.

A **estrutura secundária** das proteínas é dada pelo arranjo espacial dos aminoácidos, próximos entre si na sequência primária da proteína, através das ligações de hidrogénio que poderão ocorrer entre os grupos -NH e C=O da cadeia principal.

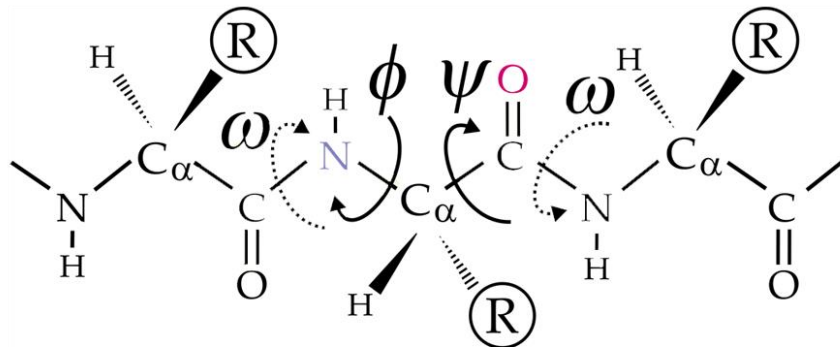


Figura 1.12 Representação dos eixos de rotação (ω , ϕ , ψ) definidos pelas ligações químicas entre os átomos do aminoácido.

A cadeia polipeptídica tem grande mobilidade rotacional, uma vez que as ligações entre o carbono α dos resíduos do aminoácido e os grupos carboxilo ($C\alpha-C$) e amina ($C\alpha-N$) possuem rotação livre sobre os seus eixos, definindo assim três eixos de rotação (ω , ϕ , ψ), **Figura 1.12**. Daí existirem as mais variadas conformações espaciais que uma cadeia peptídica pode assumir [94].

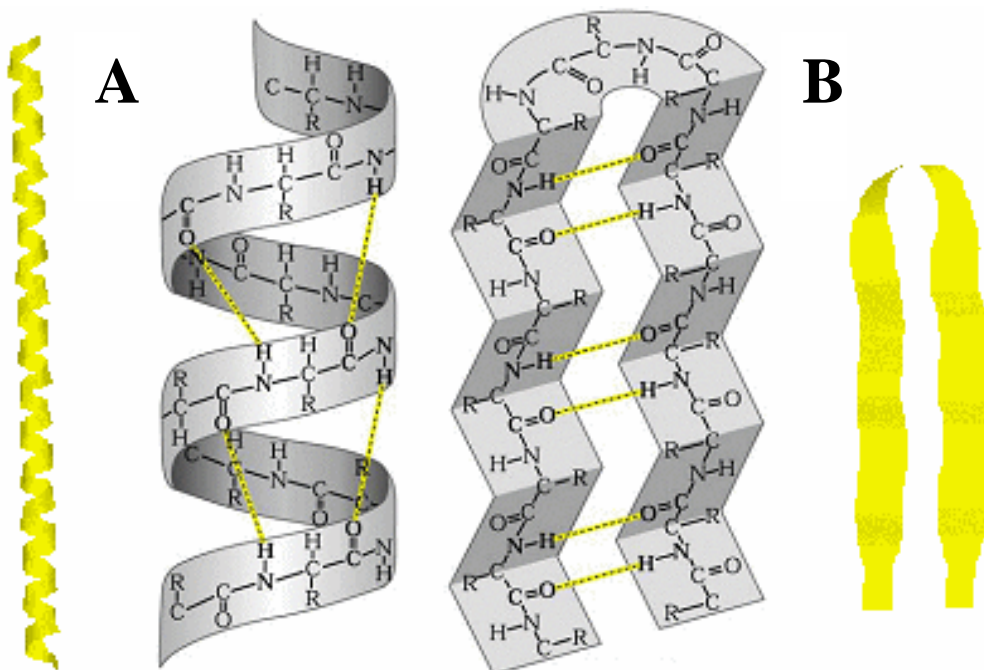


Figura 1.13 Estruturas secundárias das proteínas: (A) α -hélice e (B) folha- β .

Nas proteínas globulares existem essencialmente três tipos de arranjos estruturais resultantes das rotações em torno das ligações adjacentes à ligação peptídica que são a estrutura **α -hélice**, quando a rotação se dá no mesmo sentido, a estrutura **folha- β** , quando a rotação se dá em sentidos opostos, **Figura 1.13**, e as voltas [94].

A estrutura **α -hélice** caracteriza-se por uma hélice em espiral formada por 3,6 resíduos de aminoácidos por volta. As cadeias laterais dos aminoácidos distribuem-se para fora da hélice. A estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio orientadas paralelamente ao eixo da hélice e formadas entre os grupos C=O e N-H dos resíduos, separados por quatro resíduos intermédios. Os aminoácidos mais comuns nesta estrutura são o ácido glutâmico, a alanina e a leucina.

A **estrutura terciária** das proteínas é dada pelo arranjo espacial de aminoácidos distantes entre si na sequência polipeptídica. Este arranjo é determinado e estabilizado por todas as interações covalentes e não covalentes que poderão ocorrer: pontes dissulfito, interações de carga, forças hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e interações de *Van der Waals* entre os aminoácidos da proteína e a água e que levam à junção e ao empacotamento da proteína. O arranjo tridimensional dos átomos na estrutura terciária coincide na maioria dos casos com a estrutura nativa que é responsável pela função biológica, específica de cada proteína [94].

Muitas proteínas são constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, as subunidades. A **estrutura quaternária** das proteínas é o arranjo espacial das subunidades da estrutura terciária [94,95], resultante das ligações dissulfito, interações hidrofóbicas, interações de carga e ligações de hidrogénio, entre as subunidades. A estrutura quaternária aumenta a versatilidade de funções das proteínas, permite a formação de espaços catalíticos ou de ligação na interface das subunidades favorecendo a interação com outras moléculas, de modo a regular a sua atividade biológica [94].

1.3.4 Oxidação das proteínas

Os organismos são constantemente expostos a espécies oxidativas que, através de reações metabólicas celulares, provocam danos oxidativos em proteínas, ácidos nucleicos e lípidos [115].

Embora existam mecanismos oxidativos que fazem parte de processos biológicos e que envolvem concentrações baixas ou moderadas de espécies oxidativas, tais como modelação da atividade enzimática, sinalização ou regulação genética [116], na presença de situações de *stress* oxidativo ou de compostos oxidantes fortes, estes mecanismos tornam-se prejudiciais porque provocam alterações nas moléculas e levam à diminuição ou perda da função biológica [117–121].

Os danos oxidativos resultam de um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua respetiva eliminação pelos sistemas de defesa antioxidantes do organismo (enzimas e moléculas não enzimáticas) [116,122]. Um radical livre pode ser um átomo ou molécula com um ou mais eletrões desemparelhados nas orbitais moleculares não ligantes. Nesta forma, os radicais apresentam uma reatividade muito elevada com a maioria das espécies químicas e estão envolvidos em processos celulares que levam a alterações estruturais e funcionais das biomoléculas numa reação em cadeia [116,122].

Os radicais livres mais comuns são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de nitrogénio (RNS), e podem ocorrer por via endógena, principalmente por intermédio de processos fotoquímicos, autooxidação e reações enzimáticas, ou por via exógena com origem em fatores ambientais como a radiação ionizante, UV, raios X e gama, toxinas produzidas por fumos de exaustão e tabaco, e por agentes carcinogénicos [121,122].

As espécies reativas mais frequentes e tóxicas para os sistemas biológicos são: o radical ião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidróxilo (HO^{\bullet}), o radical hidroperóxido

(HOO^\bullet), e os radicais óxido nítrico (NO^\bullet) e dióxido nítrico (NO_2^\bullet). Outras espécies reativas tóxicas que se podem formar são: o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o anião peroxinitrito ($\text{O}=\text{NOO}^-$), que não são radicais mas participam em reações de formação de radicais livres, os radicais peróxilo e alcóxilo (ROO^\bullet e RO^\bullet), o radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) e os radicais de enxofre (RS^\bullet) [117,119,123,124].

Os principais mecanismos envolvidos na formação de ROS e RNS são [116,117,125]:

- 1) reações que envolvem processos de adição sucessiva de eletrões ao oxigénio molecular, das quais resultam intermediários reduzidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$, HO^\bullet , H_2O_2 , NO^\bullet , $\text{O}=\text{NOO}^-$);
- 2) reações de transferência de energia devido à excitação do oxigénio tripleto do estado fundamental para o estado singleto ($^1\text{O}_2$).

As proteínas são as moléculas que existem em maior percentagem nas células e por isso são os alvos primários de processos de oxidação *in vivo*. Estes processos são fundamentais porque a perda das funcionalidades da proteína pode afetar a atividade de enzimas, recetores e transportadores da membrana celular, entre outros mecanismos. Além disso, as proteínas oxidadas podem tornar-se reativas e contribuir para o desencadeamento de reações secundários noutras biomoléculas, às quais estão associados um elevado número de doenças neurodegenerativas, crónicas e inflamatórias e o envelhecimento precoce [116,117,119,123,125,126].

O ataque das espécies reativas às proteínas ocorre principalmente nas cadeias laterais dos aminoácidos, envolvendo reações de hidroxilação dos grupos aromáticos e das cadeias alifáticas dos resíduos de aminoácidos, nitratação dos resíduos de aminoácidos aromáticos, nitrosilação dos grupos sulfidril, sulfoxidação dos resíduos de metionina, cloração dos grupos aromáticos e amina primários, e a conversão de alguns

resíduos de aminoácidos em grupos carbonilo. Também pode ocorrer a clivagem da cadeia polipeptídica e a formação de agregados protéicos [118,119,121]. Mesmo que a oxidação afete apenas a cadeia lateral de um resíduo de aminoácido, toda a estrutura da proteína sofre alteração e a sua atividade biológica fica afetada.

Todos os resíduos de aminoácidos podem sofrer processos de oxidação *in vivo*, no entanto os aminoácidos cisteína, metionina e triptofano são os mais facilmente oxidados por ROS e RNS [121,127,128].

A oxidação da cisteína e da metionina ocorre devido ao baixo potencial formal de oxidação do enxofre e os mecanismos envolvidos encontram-se muito bem descritos [121,128]. Na presença de oxidantes fracos, os resíduos de cisteína são oxidados a ácido sulfénico da cisteína e os resíduos de metionina a sulfóxido de metionina (MetO), reações que podem ser biologicamente reversíveis [116,119,128,129]. Os processos mais frequentes são a oxidação irreversível da cisteína a ácido sulfínico e a ácido sulfóxido. No entanto também pode ocorrer a formação de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína livres, formando-se a cistína, [119], ou ocorrer reações de S-nitrosilação por ação das RNS [119].

Os processos oxidativos das proteínas são fenómenos fisiológicos muito relevantes, nomeadamente a oxidação da cisteína, que é cada vez mais reconhecida como um mecanismo de regulação basal, e a oxidação-redução cíclica da metionina, com reparação através da enzima metionina sulfóxido reductase (MsrA), corresponde a um importante mecanismo antioxidante dos organismos [115,119,120,128,130].

Relativamente aos resíduos de triptofano, na presença de ROS são facilmente oxidados a formilquinurenina, quinurenina e a vários derivados hidroxí. Nas mesmas condições também a fenilalanina pode ser oxidada, levando à formação de tirosina que também sofre oxidação e forma derivados dihidroxí. Os resíduos da histidina

são oxidados a 2-oxohistidina e a oxidação dos resíduos de lisina, arginina e prolina, dá origem a derivados carbonílicos [121,131]. Os derivados carbonílicos resultam não só da oxidação direta dos resíduos mas também de reações secundárias das cadeias dos aminoácidos e de reações de clivagem oxidativa das cadeias dos peptídeos ou clivagem associada à oxidação de resíduos glutamílicos. Independentemente da origem, os derivados carbonil das proteínas têm sido utilizados como marcadores da oxidação das proteínas em condições de *stress* oxidativo, estando associados a várias doenças [115].

A maioria dos sistemas biológicos contém sistemas de reparação dos danos oxidativos para manter o equilíbrio e assim evitar condições de *stress* oxidativo. Os resíduos de cisteína e metionina são particularmente sensíveis à oxidação e, para estes casos, existem os redutores dissulfeto e a enzima MsrA que reparam e convertem as formas oxidadas da cisteína e da metionina para as suas formas iniciais. Estas são as únicas reações oxidativas das proteínas que são reversíveis [120,127,132].

1.3.5 Propriedades eletroquímicas das proteínas

O estudo dos processos de transferência direta de eletrões, entre as proteínas e os elétrodos, não permite apenas avaliar os mecanismos redox, envolvendo troca de eletrões e que ocorrem nas proteínas durante os processos metabólicos, como também permite obter informações sobre a relação estrutura/função das proteínas [133–142]. São muitas as aplicações biológicas que têm por base este tipo de estudos, nas quais se destacam o desenvolvimento de vários tipos de biossensores que utilizam proteínas imobilizadas na superfície de elétrodos como elementos de reconhecimento biológico,

para medições de indicadores bioquímicos [143,144], bioreatores enzimáticos [145], implantes biomédicos [146,147] e sistemas biocatalíticos [133,148,149].

Tanto nos estudos dos processos de transferência de elétrons em solução, como no desenvolvimento de biossensores que requerem a imobilização da proteína no eletrodo, o maior desafio está em obter uma transferência eletrônica eficiente entre as proteínas e a superfície do eletrodo, que pode ser influenciada negativamente por diversos fatores [150–152]. Os centros eletroativos das proteínas (i.e. os centros ativos redox e/ou os aminoácidos eletroativos) situam-se normalmente no interior das cadeias polipeptídicas e, se a orientação das proteínas na superfície do eletrodo não for a mais adequada, a distância entre estes centros eletroativos e a superfície do eletrodo aumenta, dificultando ainda mais a transferência eletrônica [151,152]. A orientação da proteína é um dos maiores obstáculos a ultrapassar e a adsorção de macromoléculas ou de proteínas desnaturadas na superfície do eletrodo também pode dificultar a transferência de elétrons, uma vez que a superfície do eletrodo pode ficar bloqueada devido à adsorção [150,152,153].

Como forma de ultrapassar estes problemas, nos estudos dos processos de transferência direta de elétrons entre as proteínas e os eletrodos foram utilizadas inicialmente pequenas moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo que induzem a transferência de elétrons, ou foram utilizadas espécies condutoras que modificaram quimicamente a proteína, de modo a favorecer a sua orientação [135,149,150]. No entanto, estas técnicas apresentaram inconvenientes, nomeadamente a desnaturação das proteínas na superfície do eletrodo, difusão lenta das proteínas maiores e adsorção de moléculas na superfície do eletrodo [135,150,154]

Experiências voltamétricas de proteínas foram efetuadas com recurso a eletrodos revestidos com filmes ou camadas de surfactantes, polímeros redox, nanomateriais ou

pequenas moléculas quimioadsorvidas, às quais as proteínas se podem ligar electrostaticamente, facilitando a transferência direta de eletrões [149–152,154].

Mediadores redox, pequenas moléculas eletroativas que foram utilizadas, ao alternarem os seus estados de oxidação, facilmente interagem com os aminoácidos eletroativos das proteínas permitindo a transferência de eletrões, minimizando os efeitos de atração e repulsão entre as proteínas e o eléctrodo [154–156]. Todavia, em alguns casos, o mediador pode interferir com os processos de eléctrodo e dificultar a transferência de eletrões [149].

Como alternativa ao uso de mediadores, a investigação eletroquímica de proteínas pode realizar-se através da imobilização da proteína diretamente na superfície do eléctrodo. Deste modo, as interações entre o filme da proteína e o eléctrodo são controladas, facilitando a transferência de eletrões, a difusão é eliminada e podem obter-se os parâmetros cinéticos e termodinâmicos [149,157].

O processo de adsorção das proteínas pode ser afetado pelas propriedades da superfície do eléctrodo, pela natureza das proteínas e pelas condições da solução nomeadamente a temperatura, pH, força iónica e a composição da solução tampão [158–160]. O pH da solução influencia diretamente a orientação porque vai determinar o estado electrostático das proteínas isto é, o número e a natureza das cargas que estão presentes na superfície das proteínas [158,159].

A maior parte dos estudos eletroquímicos diretos, sem mediadores redox, de proteínas referiam-se inicialmente à investigação de proteínas que possuem centros ativos redox, tais como citocromos, ferredoxinas, proteínas que contém elementos como cobre, ferro, enxofre, entre outros [30,143,161–169].

Mais recentemente, o estudo eletroquímico dos diferentes aminoácidos constituintes das proteínas, que apresentam comportamento eletroquímico,

nomeadamente a tirosina, triptofano, cisteína, metionina e histidina, veio permitir avaliar as propriedades redox de outras proteínas. Os estudos eletroquímicos de proteínas que têm por base as propriedades redox dos aminoácidos eletroativos foram realizados com elétrodos de carbono de vários tipos: elétrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* - GCE) [106,170–172], elétrodo de pasta de carbono (*carbon paste electrode* – CPE) [168,170,173], elétrodos de grafite [170,174,175], elétrodo de fibra de carbono (*carbon fiber electrode* – CFE) [176], elétrodo de diamante dopado com boro (*boron doped diamond electrode* – BDDE) [106,177] e elétrodos impressos de carbono (*carbon screen printed electrodes* - SPCE) [178–180].

A investigação das propriedades redox de proteínas através da avaliação da resposta eletroquímica dos seus aminoácidos oxidáveis representa uma alternativa inovadora, com diversas aplicações importantes, em especial na área dos biossensores e da biotecnologia. Neste sentido, a segunda parte deste trabalho está relacionada com a investigação do comportamento redox de proteínas diretamente na superfície do GCE, especificamente a calmodulina e as diferentes caveolinas 1, 2 e 3.

1.3.6 Calmodulina

As proteínas de ligação contêm domínios específicos que permitem a ligação reversível de moléculas, proteínas e enzimas, activando-as de modo a exercerem a sua função nos organismos. De facto, muitas moléculas só exercem a sua função após a sua interação com as proteínas de ligação. A análise das proteínas de ligação através do estudo das transferências de eletrão pode ajudar a entender as suas funções biológicas.

A calmodulina (CaM) é uma proteína de ligação de várias moléculas, tais como as proteínas neuromodulina, neurogranina, algumas enzimas e miosinas, e também da isatina [181,182].

A calmodulina tem uma importância fisiológica fundamental, é uma das mais importantes proteínas de sinalização e regulação de vários canais dependentes de cálcio [183,184].

A calmodulina é uma proteína de baixo peso molecular presente em todas as células eucarióticas, com uma sequência de aminoácidos bem conservada, e idêntica para todos os organismos vertebrados [185,186]. A sua estrutura é formada por dois domínios, N- e C-terminal, cada um com dois motivos estruturais denominados de mãos-EF [183,186]. O domínio N-terminal que contém as mãos EF-1 e EF-2 representa-se por CaM₁₂ e o domínio C-terminal que contém as mãos EF-3 e EF-4 representa-se por CaM₃₄. Ambos os domínios estão ligados por uma α -hélice central flexível, **Figura 1.14** [183].

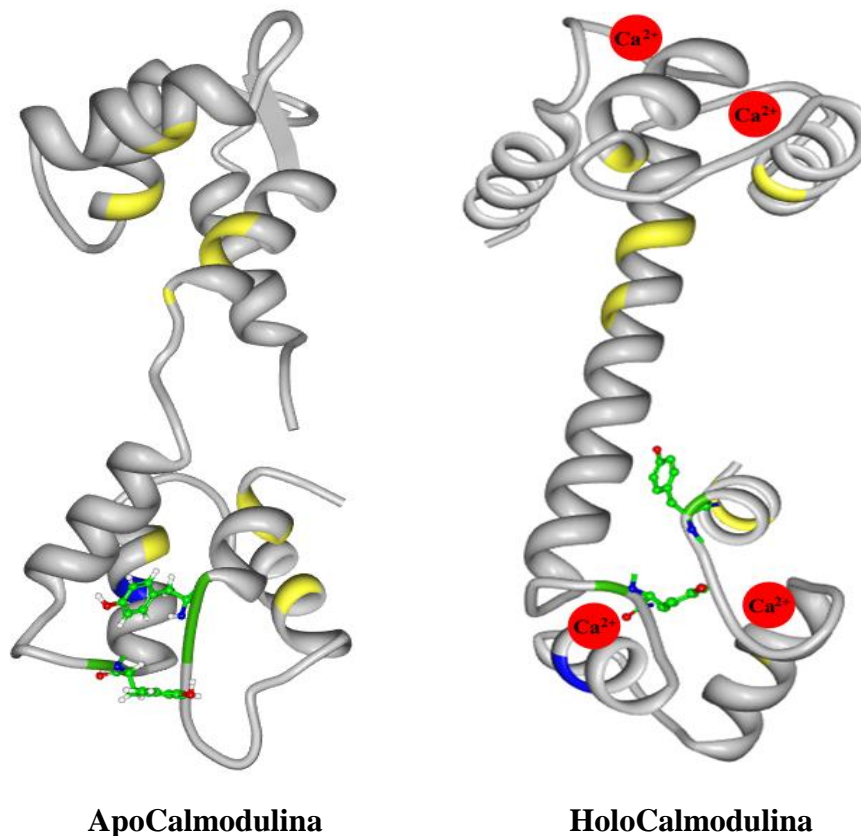


Figura 1.14: Estruturas tridimensional da ApoCalmodulina e da HoloCalmodulina com os íons de cálcio representados (vermelho) e com os resíduos eletroativos assinalados: metionina (amarelo), tirosina (verde) e histidina (azul) (adaptado de [114]).

O motivo estrutural do tipo mãos-EF é a estrutura mais comum encontrada nas proteínas de ligação do cálcio [187]. A topologia é do tipo hélice-volta-hélice, com aproximadamente 40 resíduos, em que as hélices são representadas pelos dedos polegar e indicador, e a volta octaédrica é representada pelo dedo do meio, na qual se estabelecem as ligações aos íons de cálcio [187].

A calmodulina pode agregar no máximo quatro íons de cálcio (dois por domínio) e existe em duas formas distintas: a forma livre sem cálcio ApoCalmodulina (ApoCaM) e a forma saturada de cálcio HoloCalmodulina (HoloCaM), **Figura 1.14**, [183,188]. Com o aumento da concentração de cálcio a nível intracelular, ocorre a ligação Ca^{2+} -CaM que provoca uma alteração na conformação da proteína para a “forma aberta”, permitindo expor as superfícies hidrofóbicas em cada um dos domínios [183].

A estrutura da CaM é formada por 148 resíduos de aminoácidos, dos quais apenas a metionina (10 resíduos), a tirosina (2 resíduos) e a histidina (1 resíduo) apresentam comportamento eletroquímico na superfície do GCE. Os domínios da HoloCaM são pois, ricos em resíduos de metionina, cuja flexibilidade e elevada polarizabilidade juntamente com os outros resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, permitem a formação de áreas suscetíveis à interação e agregação das moléculas-alvo da CaM [183,187]. Deste modo, a CaM pode ligar-se a um elevado número de peptídeos, enzimas e proteínas, de diferentes formas e tamanhos, ativando-as de modo a exercerem a sua atividade através de mudanças bioquímicas e celulares [187,189]. Por exemplo, a síntese do óxido nítrico, molécula fundamental em vários processos biológicos, ocorre através de uma reação que envolve a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (endotelial nitric oxide synthase – eNOS) ativada pela HoloCaM [190–193].

A HoloCaM é responsável pelo controlo e mediação de inúmeros processos fisiológicos, entre os quais o crescimento, a proliferação e movimento celular, a síntese

e libertação de neurotransmissores, a regulação da concentração de cálcio intracelular, a contração muscular, a expressão genética e os processos reprodutivos (2,3). No entanto, a ligação com o cálcio não é de todo essencial, a ApoCaM também possui funções reguladoras ao permitir a ligação de várias proteínas (neuromodulina, neurogranina, etc.), enzimas e miosinas, que se conseguem ligar à CaM na ausência ou com concentrações muito reduzidas de cálcio [185,194].

Os mecanismos de sinalização dependentes da CaM envolvidos na regulação da proliferação celular, morte celular programada e autofagia são fundamentais na biologia das células cancerígenas [184]. Vários estudos associam o aumento dos níveis de CaM, não só a vários tipos de cancro [184,195–198], como também à progressão de várias doenças, nomeadamente a escoliose idiopática do adolescente [199,200], doenças neurodegenerativas [201,202] e diabetes [203–205].

Devido à importância da CaM, torna-se fundamental desenvolver métodos de análise para a sua determinação e quantificação, essenciais na investigação e desenvolvimento de diagnósticos clínicos, potenciais fármacos e biossensores. Os métodos de análise existentes baseiam-se em técnicas de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), eletroforese capilar e espectrometria de UV, aplicados em estudos bioquímicos, termodinâmicos e estruturais, para a determinação quantitativa da ApoCaM e da HoloCaM e para a investigação das alterações conformacionais resultantes da interação com o cálcio [206–210].

No *Capítulo 6* é apresentado o estudo eletroquímico da CaM, com base na avaliação eletroquímica dos seus aminoácidos oxidáveis na superfície do GCE, que permitiu avaliar as alterações conformacionais da CaM induzidas pela presença/ausência de cálcio no meio [211].

1.3.7 Caveolinas

As cavéolas são invaginações endocíticas/exocíticas da membrana plasmática, de 50-100 nm, geralmente em forma de Ω ou balão, muito ricas em colesterol, glicosfingolípídios, caveolinas e proteínas de membrana lípido-ancoradas, **Figura 1.15** [212–215]. Caracterizam-se pela presença de caveolinas, proteínas estruturais específicas destas invaginações, que podem ocorrer em diferentes densidades e diferentes tipos de células, no entanto são mais abundantes nos fibroblastos, nas células musculares lisas, endoteliais, epiteliais e nos adipócitos [213,215].

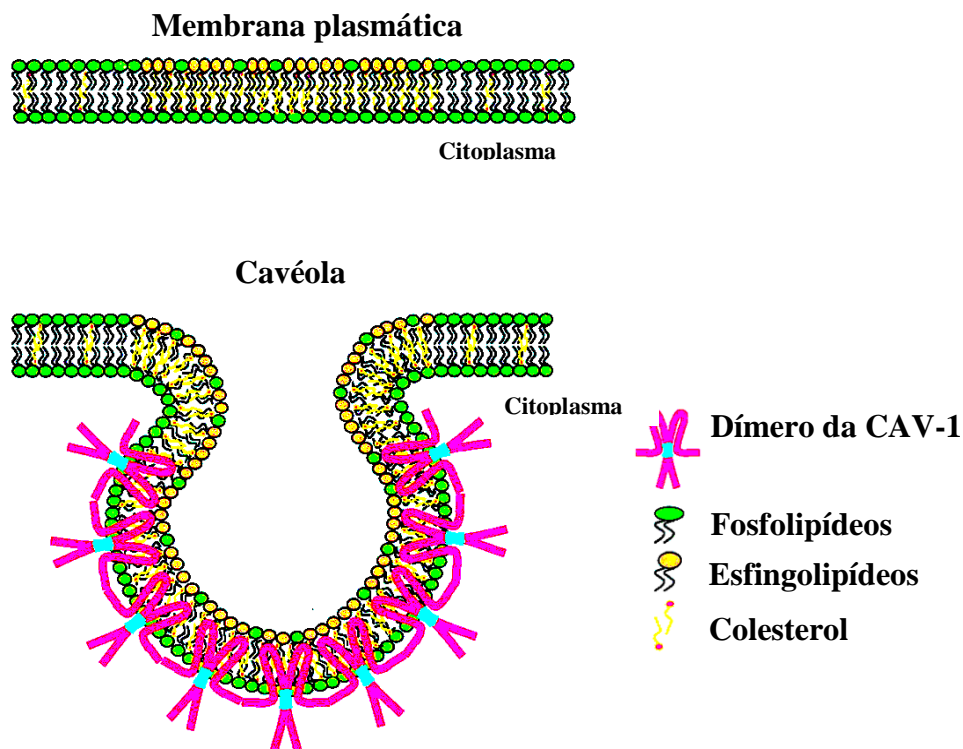


Figura 1.15 Representação da estrutura de uma cavéola formada a partir de domínios da membrana celular ricos em colesterol e esfingolípídios, através da integração da proteína caveolina-1. Os monómeros da caveolina-1 associam-se através do domínio de oligomerização (azul) para formar homo-oligómeros, com 14 a 16 moléculas de caveolina-1, dando forma à invaginação da membrana (adaptado de [212]).

Diversos estudos demonstraram que as cavéolas estão associadas ao transporte reverso do colesterol [212,216–219], ao metabolismo lipídico, ao transporte vesicular [212], à migração e adesão celular, à sinalização de cálcio [219], à entrada de agentes patogênicos [218,220,221], ao controle do ciclo celular e transformação celular, além de serem fundamentais na sinalização e transdução de sinais e na supressão de tumores [214,215,218,222–225].

As caveolinas são as proteínas essenciais para a formação das cavéolas. Os mamíferos apresentam três tipos de caveolinas, sendo elas a caveolina 1 (CAV-1), a caveolina 2 (CAV-2) e a caveolina 3 (CAV-3) [213,223]. A CAV-1 é a mais importante e é determinante para a estrutura e função das cavéolas. Encontra-se em maior concentração nas células adiposas, endoteliais e epiteliais, fibroblastos e células do músculo liso [222,226]. A CAV-2 está diretamente relacionada com a CAV-1, enquanto que a CAV-3 encontra-se exclusivamente nas células dos músculos estriados (cardíaco e esquelético) e do músculo liso [222,227].

A CAV-1 é uma proteína de membrana bem estruturada, constituída por 178 aminoácidos e pode apresentar os isômeros α e β , que derivam do mesmo gene.

As duas extremidades citoplasmáticas N e C-terminal da CAV-1 estão separadas por um segmento hidrofóbico (resíduos 102-134) que não atravessa a membrana, **Figura 1.15** [222,228]. A CAV-1 possui dois domínios funcionais, sendo o domínio estruturante CSD (*Caveolin Scaffolding Domain*) situado nos resíduos 82-101, **Figura 1.16**, fundamental para a interação da CAV-1 com as moléculas sinalizadoras, nomeadamente os recetores acoplados à proteína G (GPCRs), quinases do tipo Src, canais iónicos, eNOS, entre outras [227,229,230]. Um exemplo de mediação bem estudada é a que ocorre nas células endoteliais, na qual a CAV-1 interage com a enzima eNOS através do domínio CSD, de forma a inibir a sua atividade [231–233].

A libertação e ativação da enzima ocorrem devido à sua afinidade com a molécula HoloCaM, que mantém a eNOS suscetível de ser ativada para a síntese do óxido nítrico [190,191,234].

As proteínas CAV-1 e CAV-3 apresentam uma semelhança de 65% a 85% na sequência dos seus aminoácidos, **Figura 1.16**. As três proteínas possuem os aminoácidos metionina, tirosina, histidina, triptofano e cisteína, que apresentam comportamento eletroquímico na superfície do GCE.

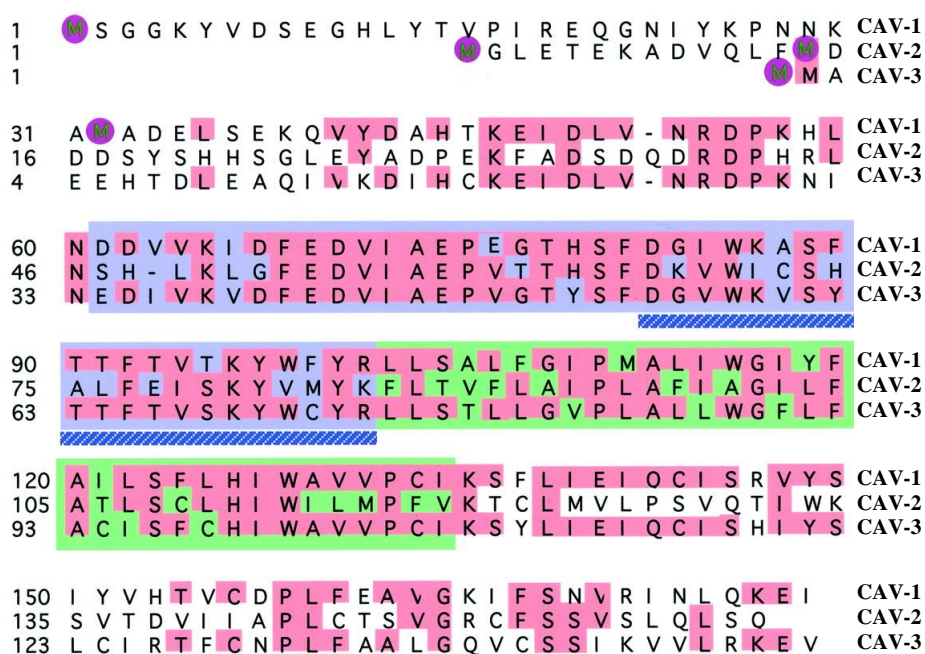


Figura 1.16 Estrutura primária das proteínas CAV-1, CAV-2 e CAV-3 de genes humanos. Na imagem estão identificados os resíduos idênticos (rosa), os segmentos transmembranares (verde), os domínios de oligomerização (azul claro) e os domínios estruturais *Caveolin Scaffolding Domain-CSD* (azul escuro) (adaptado de [212]).

A CAV-1 está em constante interação com a membrana plasmática e com a fisiologia da célula, e por isso são muitas as suas funções fisiológicas. As mais relevantes são: (i) a formação das cavéolas, a CAV-1 tem uma grande afinidade com o colesterol e liga os principais componentes das cavéolas, colesterol e esfingolipídios [216,217,230]; (ii) a regulação dos níveis de colesterol nas células [212,230,235]; (iii) a

sinalização celular [227,228,230,236]; (iv) a transformação celular e oncogénica [232,237,238] e (v) a transdução de sinais [239]. Muitas destas funções são partilhadas pela CAV-2 e estão diretamente relacionadas com as cavéolas. A CAV-3 é fundamental na sinalização e modelação celular, mas só nas células dos músculos estriados e liso.

As mutações nos genes das caveolinas estão associadas a várias doenças dos seres humanos, incluindo distrofias músculo-esqueléticas, no caso do gene da CAV-3, doenças associadas ao *stress* oxidativo, alterações cardíacas, lipodistrofias e tumores [231,237,240]. O modo de ação da CAV-1 na progressão de tumores não está bem explícito uma vez que os estudos existentes revelam resultados contraditórios. O papel da CAV-1 depende do tipo de tumor, existem casos em que ocorre a inibição da metástase, adesão, proliferação e migração celular, no entanto, para outros tipos de tumor, estes fenómenos são induzidos [214,238,241].

Os estudos desenvolvidos indicam que as caveolinas são marcadores bioquímicos das cavéolas e do colesterol, e poderão vir a ser utilizadas também como marcadores do *stress* oxidativo e de alguns tipos de cancro [238,242,243]. Devido à ação exercida no organismo humano, o desenvolvimento de métodos para a determinação rápida em fluidos corporais, assim como as informações obtidas a partir do estudo das suas reações redox podem ser utilizadas no desenvolvimento de sensores bioquímicos apropriados para análise e diagnósticos precoces, previsão de prognósticos e, eventualmente, no desenvolvimento de tratamentos mais adequados.

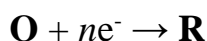
Dada a importância destas proteínas e, uma vez que não existem estudos eletroquímicos realizados, são apresentados no *Capítulo 7* os resultados do estudo com base na avaliação eletroquímica dos resíduos de aminoácidos oxidáveis no GCE. Devido à ligação existente entre a CAV-1 e o colesterol também é avaliada a interação da proteína com a molécula de colesterol.

1.4 Princípios da eletroquímica

Neste capítulo são descritas as técnicas eletroquímicas que foram utilizadas nos estudos efetuados durante o presente trabalho e são apresentadas de uma forma concisa a informação considerada mais relevante para a obtenção dos resultados.

A eletroquímica envolve o estudo dos fenômenos químicos que estão associados à separação de cargas num determinado sistema [244,245]. A maioria dos processos de transferência de carga envolvem a transferência heterogênea de elétrons na superfície do eletrodo, mas também podem ocorrer reações homogêneas em solução. O eletrodo atua apenas como dador (no caso de uma redução) ou como recetor (no caso de uma oxidação) de elétrons transferidos para ou de espécies em solução.

Para uma reação de eletrodo, o estado de equilíbrio é caracterizado pela equação de Nernst, que relaciona o potencial do eletrodo com a concentração das espécies em solução. Considerando o caso geral da reação redox,



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

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

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

No caso de uma redução, a transferência de elétrons a partir do eletrodo só pode ocorrer se existir uma energia mínima necessária antes da transferência, a qual

corresponde a um potencial suficientemente negativo (em volts). Para uma oxidação, o menor nível desocupado do elétrodo pode ter uma determinada energia máxima que lhe permite receber eletrões das espécies em solução, a qual corresponde a um potencial suficientemente positivo (em volts) [245].

Na realidade, para assegurar eletroneutralidade, ocorrem sempre duas meias-reações de transferência de carga, em direções opostas. À exceção de reações redox homogéneas, as reações de transferência de carga estão separadas espacialmente e, normalmente ocorrem em elétrodos diferentes, imersos em solução dentro da mesma célula eletroquímica [245]. Os elétrodos estão ligados por meios condutores, externamente através de fios condutores (fios elétricos), e no interior da solução através do eletrólito inerte (transporte iónico), de tal modo que a carga pode ser transportada.

Em todos os processos eletroquímicos, a reação eletroquímica ocorre sempre no *elétrodo de trabalho*, na interface elétrodo-eletrólito inerte. O potencial deste elétrodo é controlado através do *elétrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato. O elétrodo de referência utilizado na experiência eletroquímica deve possuir uma impedância elevada de modo a não passar corrente por ele. A corrente da célula eletroquímica flui entre o elétrodo de trabalho e o *elétrodo auxiliar* através do eletrólito inerte. Escolher a técnica eletroquímica adequada e ter conhecimento de todos os processos que ocorrem no elétrodo de trabalho é fundamental na obtenção e explicação dos dados experimentais.

Durante uma experiência eletroquímica, em que é aplicado um potencial conhecido ao elétrodo de trabalho, várias espécies eletricamente carregadas podem ocorrer na superfície do elétrodo, sendo depois atraídas para a superfície do elétrodo através de forças eletrostáticas. Simultaneamente, as outras espécies presentes na solução também podem interagir com a superfície do elétrodo de trabalho através da

adsorção. Como consequência desta interação, numa experiência eletroquímica é necessário ter em conta o transporte das espécies do interior da solução para a superfície do eletrodo e a reação de transferência de eletrão daí resultante, que ocorre na superfície do eletrodo. Na interface eletrodo | solução as interações são diferentes relativamente ao interior da solução.

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

O transporte de massa por convecção é provocado pelo movimento da solução e consequentemente das espécies devido a forças mecânicas, e pode ser controlado quando se agita a solução.

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

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

Na proximidade da superfície do eletrodo (*camada de difusão*) as espécies são transportadas só por difusão, **Figura 1.17**, [244,245].

Na **Figura 1.17** distinguem-se os seguintes parâmetros de grande importância:

- k_d – coeficiente de transferência de massa que descreve a velocidade de difusão no interior da camada de difusão, junto à superfície do eletrodo. Este processo é descrito pelas leis de Fick;

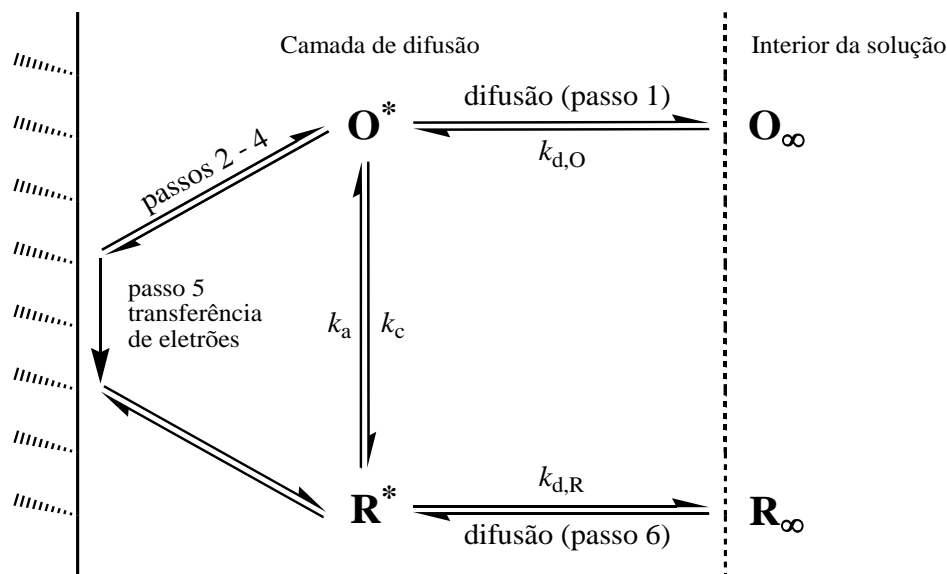


Figura 1.17 - Esquema da transferência de elétron numa superfície de eletrodo; *passo 1* – difusão; *passo 2* – rearranjo da atmosfera iônica; *passo 3* – reorientação dos dipolos do solvente; *passo 4* – alterações nas distâncias entre o íon central e os ligandos; *passo 5* – transferência do elétron [244].

- k_a e k_c – constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica respectivamente, que descrevem a cinética da reação do eletrodo. As constantes de transferência de carga estão descritas pelas fórmulas de Butler – Volmer:

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

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

onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reação eletroquímica.

- $k_{d,O}$ e $k_{d,R}$ – coeficientes de transferência de massa das espécies O e R, que geralmente são diferentes, uma vez que os coeficientes de difusão também são diferentes;
- a formação da *dupla camada eletrolítica*, isto é, a região interfacial onde ocorrem as reações eletrolíticas e onde o valor do potencial eletrostático difere do interior da solução. O conceito básico consiste num ordenamento de cargas na superfície do eletrodo e num ordenamento de uma quantidade igual de carga

oposta para neutralizar a carga do eletrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eletrodo e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial na solução é a *capacidade da dupla camada* [244,245].

As constantes de velocidade de transferência de carga k_a e k_c dependem do potencial e da constante de velocidade padrão, o que conduz aos seguintes casos extremos:

- $k_d \ll k_0$ – *sistema reversível*, para qualquer potencial a superfície do eletrodo está sempre em equilíbrio. A corrente é determinada só pelas diferenças de energia eletrônica entre o eletrodo e as espécies na solução e a sua velocidade para alcançar a superfície do eletrodo.
- $k_d \gg k_0$ – *sistema irreversível*, para a reação ocorrer é necessário aplicar potenciais mais elevados, em comparação com os sistemas reversíveis. O transporte de massa não influencia a constante de transferência de carga e o processo é controlado pela cinética lenta da reação.

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

As propriedades do eletrodo de trabalho têm uma grande importância uma vez que influenciam os resultados das medidas eletroquímicas. A escolha de um material de eletrodo depende de alguns factores, principalmente da zona de potenciais úteis no solvente utilizado e da qualidade e pureza do material [245].

1.4.1 Eléctrodo de carbono vítreo

O carbono é um material muito usado no fabrico de eléctrodos e encontra-se disponível numa variedade de microestruturas: carbono vítreo, fibras, nanotubos de carbono, grafeno, carbono negro, várias formas de grafite e de pasta de carbono, e de diamante dopado. O mais extensamente estudado e utilizado em experiências eletroquímicas é o carbono vítreo, que se encontra disponível em diversas formas incluindo cilindros, discos e placas.

A sua fabricação consiste na carbonização por aquecimento de polímeros fenol/formaldeído ou de poliacrilonitrilo entre 1000 e 3000°C sob pressão. O tratamento térmico é aplicado lentamente ao longo de dias e provoca a expulsão dos átomos que não são carbono e este tratamento produz uma microestrutura de carbonos conjugados [245]. O carbono vítreo é duro e isotrópico.

O carbono tem atividade superficial elevada, o que explica a sua suscetibilidade ao bloqueamento do eléctrodo por compostos orgânicos. Na superfície do carbono podem ocorrer ligações com hidrogénio, grupos hidroxilo e carbonilo, o que significa que o comportamento destes eléctrodos pode ser muito sensível ao pH [245].

O carbono vítreo é impermeável a líquidos e gases, fácil de polir e compatível com quase todos os solventes comuns. Estas propriedades levam à sua utilização generalizada na eletroquímica para determinar mecanismos de reacção e para análise voltamétrica de vários compostos. A resistência do carbono vítreo é pequena para a maioria das aplicações eletroquímicas. A estrutura dos poros aleatórios impede a entrada do solvente, mas nos poros localizados à superfície do eléctrodo pode ocorrer a inserção pouco profunda de iões de electrólito. As cavidades ocasionais, formadas devido à presença de bolhas de gás durante o tratamento térmico, ocupam uma fração mínima da área do eléctrodo e não afetam significativamente a resposta eletroquímica.

A rugosidade da superfície depende assim da técnica de preparação. A corrente basal do carbono vítreo é geralmente superior à dos compósitos de grafite, uma vez que toda a sua superfície é ativa [245].

1.4.2 Técnicas de voltametria

Existem várias técnicas que permitem estudar os processos de eletrodo, mas as mais utilizadas são as técnicas de voltametria, usadas para identificar espécies presentes em solução, obter dados quantitativos e qualitativos e também permitem estudar a natureza e os mecanismos das reações que ocorrem no sistema eletroquímico [246–248].

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

$$I_t = I_c + I_f$$

A corrente faradaica, I_f , devido à reação do eletrodo, é registada na zona relevante de potencial onde se dá a reação de transferência de eletrões. A corrente capacitiva, I_c , é devida à variação de carga da dupla camada e aumenta com o potencial e com o aumento da velocidade de varrimento.

Em cada experiência voltamétrica o potencial aplicado tal como a corrente medida variam com o tempo. A curva de corrente em função do potencial, $I = I(E)$, registada no decorrer do ensaio voltamétrico designa-se por *voltamograma* ou *onda voltamétrica*. A variação de potencial com o tempo é designada por *velocidade de varrimento*, v .

As técnicas de voltametria mais usadas são:

- *técnicas de varrimento cíclico de potencial* – incluem a voltametria cíclica e consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial, que varia de forma cíclica com o tempo e para diferentes velocidades.
- *técnicas de degrau e impulso* – incluem a voltametria de impulso diferencial e de onda quadrada e consistem na aplicação ao eletrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente que altera instantaneamente o sistema e é medida a diferença.

1.4.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry* - CV) é a técnica mais utilizada para iniciar o estudo eletroquímico de uma determinada substância. Esta técnica permite obter informações sobre a cinética das reações de transferência de elétrons, sobre as reações químicas acopladas e sobre os processos de adsorção [245].

A principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas, identificar espécies presentes em solução através do estudo dos seus potenciais redox e para a análise semiquantitativa de velocidades de reações. Não é uma técnica recomendada para determinações analíticas uma vez que não apresenta a sensibilidade requerida para determinações quantitativas, sendo facilmente superada pelas técnicas de degrau e impulso.

A voltametria cíclica envolve a aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho, que se altera em função do tempo, **Figura 1.18A**. O potencial aplicado varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE / dt$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f) previamente escolhidos, como demonstrado na **Figura 1.18A**.

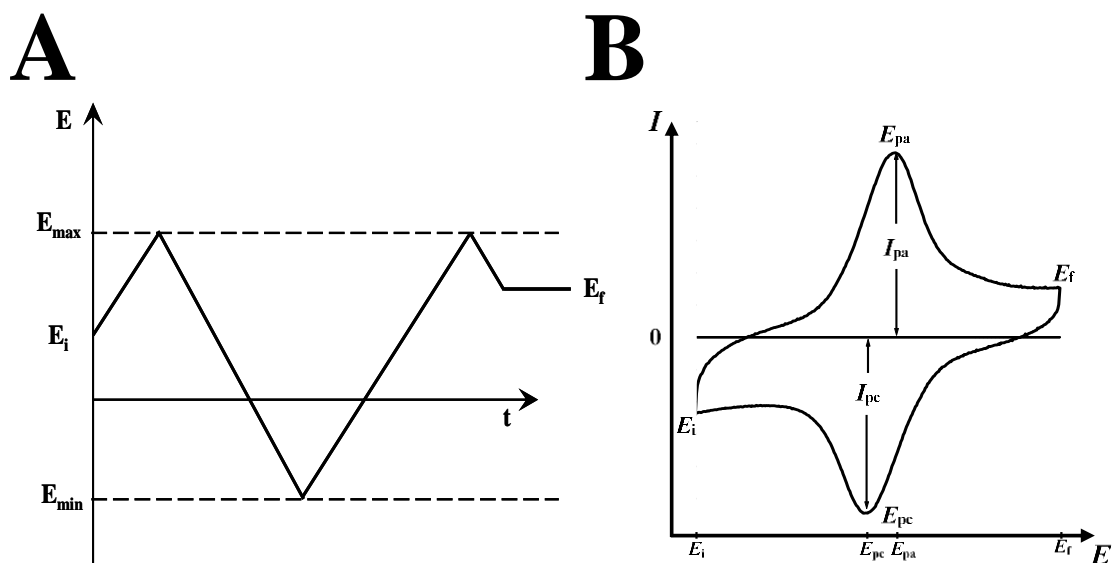


Figura 1.18 (A) Representação esquemática da variação de potencial com o tempo em voltametria cíclica. E_i – potencial inicial, E_f – potencial final, E_{\max} – potencial máximo, E_{\min} – potencial mínimo. (B) Voltamograma cíclico para uma reação reversível [245].

Depois de iniciado o varrimento de potencial, o sentido deste é invertido quando se atinge um valor de potencial máximo (E_{\max}), e novamente é invertido quando a seguir se atinge um valor de potencial mínimo (E_{\min}), e assim sucessivamente de uma forma cíclica, daí resulta o nome da técnica. O sentido do varrimento de potencial pode ser positivo ou negativo. Os parâmetros importantes a definir são: o potencial inicial (E_i), a direção de varrimento inicial, a velocidade de varrimento, ν , o potencial máximo, E_{\max} , o potencial mínimo, E_{\min} , e o potencial final, E_f .

Na **Figura 1.18B** apresenta-se o voltamograma cíclico que se obtém para um processo de transferência de carga reversível, no qual o produto da oxidação (ou redução) é posteriormente reduzido (ou oxidado) assim que ocorre a inversão do sentido do varrimento de potencial.

Para uma reação descrita pela equação $O + ne^- \rightleftharpoons R$, inicialmente só com espécies O em solução, durante o varrimento são geradas electroquimicamente espécies R, quando o potencial aplicado se torna suficiente “negativo”. Depois de invertida a

direção do varrimento para o sentido positivo, as espécies R são oxidadas para O, conforme indica a corrente anódica. Sendo assim, a voltametria cíclica permite gerar rapidamente novas espécies durante o varrimento e, de seguida, analisa a espécie gerada no varrimento em sentido contrário, um pormenor muito importante atribuído a esta técnica [244,245].

Os parâmetros importantes que permitem a caracterização do processo de eletrodo do sistema em estudo são: o potencial do pico anódico (E_{pa}), a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de oxidação ou pico de corrente anódica (I_{pa}), o potencial do pico catódico (E_{pc}), e a intensidade máxima de corrente que resulta da reação de redução ou pico de corrente catódica (I_{pc}).

As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reação de transferência de carga e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reação.

Existem várias relações entre os parâmetros definidos e a velocidade de varrimento de potencial, que fornecem informações de natureza termodinâmica e cinética e que permitem caracterizar o sistema.

Transferência eletrónica reversível

As condições necessárias para que num determinado sistema eletroquímico ocorra uma transferência eletrónica com comportamento reversível são:

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

A aplicação das condições de reversibilidade permite calcular o número de elétrons transferidos na reação eletroquímica. Se a reação for reversível, pode também calcular-se o potencial formal de redução, $E^{0'}$, pela equação:

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

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

Transferência eletrônica irreversível

Se a velocidade de reação de transferência eletrônica for lenta em relação à escala de tempo da experiência (e em relação à velocidade de transporte de massa por difusão) então, o sistema não obedece à *equação de Nernst*. Como consequência, observa-se o desvio dos picos catódicos para potenciais mais negativos e dos picos anódicos para potenciais mais positivos.

A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e os valores de I_{pa} e I_{pc} tornam-se bastante diferentes. Sendo assim, um sistema que para velocidades de varrimento baixas apresenta comportamento reversível, pode apresentar-se como não-reversível quando a velocidade de varrimento aumenta. No caso de uma reação irreversível o perfil voltamétrico é o mesmo, mas quando se inverte a direção do varrimento podem não aparecer picos de corrente no varrimento inverso.

As condições necessárias para que ocorra uma transferência eletrônica com comportamento irreversível são:

$$\left| \begin{array}{l} |E_p - E_{p/2}| = 47,7/(\alpha n') \text{ (mV)} \\ \left| \frac{\partial E_{pa}}{\partial \log v} \right| = \frac{29,6}{\alpha n} \text{ mV} \\ E_p \text{ dependente de } v \end{array} \right.$$

onde n' é o número de elétrons transferidos no passo determinante da velocidade da reação e α é o coeficiente de transferência de carga eletroquímica.

Desde que $\alpha \approx 0,5$ para ambos os processos, então $|I_{pa} / I_{pc}| \approx 1$ e o potencial formal pode ser aproximadamente dado pela equação utilizada para sistemas reversíveis.

A região de escala de tempo (ou de ν) intermédia entre os processos reversível e irreversível é denominada de quasi-reversíveis e, nestes casos, a cinética das reações de oxidação e de redução tem que ser considerada simultaneamente. Em sistemas quasi-reversíveis, observa-se um pico reverso, mas com $\Delta E_p > 57 / n$ mV.

Espécies adsorvidas no eletrodo

A resposta voltamétrica de um sistema eletroquímico é muitas vezes modificada devido à adsorção de reagentes ou dos seus produtos de reação na superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que é eliminada a difusão da solução na superfície do eletrodo. Há duas situações específicas que são:

- a velocidade de reação de espécies adsorvidas é muito maior do que a de espécies em solução
- considerar separadamente as reações todas as espécies adsorvidas e das que se encontram em solução.

As moléculas orgânicas, devido ao caráter hidrofóbico, adsorvem facilmente na superfície de eletrodos sólidos. Foi demonstrado que as moléculas orgânicas podem estar orientadas na superfície do eletrodo seguindo uma geometria específica das várias orientações, consoante o potencial aplicado ao eletrodo ou da concentração da substância na solução. Independentemente da orientação das moléculas adsorvidas, o fenómeno tem uma grande influência sobre os resultados eletroquímicos [245].

Os efeitos da adsorção na resposta voltamétrica são vários, desde o efeito catalítico da reação redox até ao fenómeno mais comum que é o bloqueamento da superfície do eléctrodo e conseqüentemente, a forma da onda voltamétrica é alterada. Na literatura encontram-se vários estudos sobre os efeitos da adsorção de espécies na superfície de eléctrodos [249–255]. A corrente de pico, o potencial de pico e a forma analítica de um voltamograma cíclico para reações irreversíveis foram teoricamente calculadas, para situações em que as espécies em estudo estão adsorvidas na superfície do eléctrodo.

Na **Figura 1.19** está representado o caso particular da adsorção de um reagente ou de um produto de uma reação de eléctrodo em que o voltamograma cíclico é simétrico, com o potencial dos picos de oxidação e redução coincidentes. Nesta reação reversível, só as espécies adsorvidas O e R contribuem para a reação total.

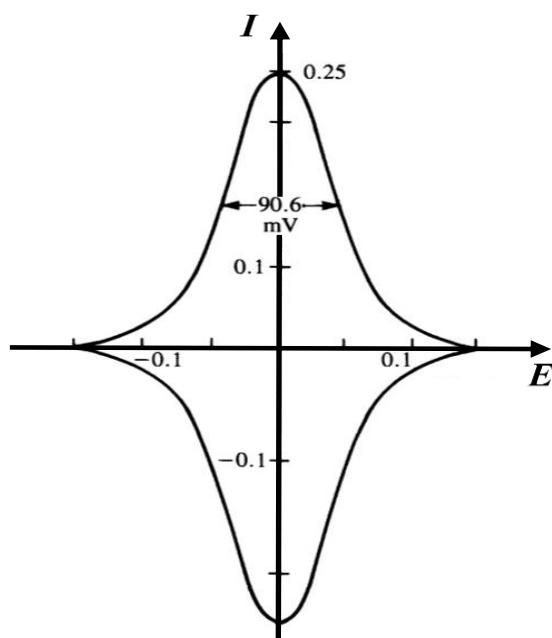


Figura 1.19 Voltamograma cíclico para um sistema reversível de espécies adsorvidas na superfície do eléctrodo.

A curva corrente-potencial para a espécie O adsorvida inicialmente na superfície do eletrodo é dada por:

$$I_{pa} = nFAv \Gamma (4RT)^{-1}$$

onde Γ é a concentração de superfície da espécie adsorvida, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura absoluta, I_p é o valor da corrente de pico, n é o número de elétrons transferidos, F é a constante de Faraday, A é a superfície do eletrodo e v é a velocidade de varrimento. Esta equação é válida apenas para sistemas reversíveis, em que a velocidade de varrimento é inferior a 10 mV s^{-1} e, nestes casos é possível determinar o número de elétrons transferidos pela largura a meia altura do pico de corrente $W_{1/2} = 90,6 / n \text{ mV}$, **Figura 1.19** [245].

Para valores baixos de velocidade de varrimento, o potencial do pico, E_{pa} , não sofre alteração, mas à medida que a velocidade aumenta, o sistema perde a sua reversibilidade e a curva corrente-potencial perde a simetria devido ao afastamento progressivo dos picos anódico e catódico para potenciais mais positivos ou mais negativos, respetivamente. Nesta situação, é possível determinar a constante de velocidade padrão, k_0 , utilizando a equação:

$$k_0 = (\alpha n) F v_c (RT)^{-1}$$

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

A complexidade de um sistema eletroquímico reflete-se no voltamograma cíclico correspondente, que pode apresentar um ou vários picos de anódicos e catódicos, consoante o número de reações eletroquímicas sucessivas ou os diferentes passos consecutivos que ocorrem na reação. A posição do segundo pico está relacionada com a primeira reação eletroquímica, se é energeticamente mais fácil ou mais difícil do que a primeira. A escolha do intervalo de potencial e de potenciais de inversão diferentes, depois do primeiro pico e antes do segundo, permite identificar quais os picos que

aparecem no varrimento inverso e quais os que aparecem no varrimento inicial. Estas informações permitem identificar as espécies em solução e efetuar propostas relativamente aos seus mecanismos redox [245].

Processos de eléctrodo com reações homogéneas acopladas

A transferência de carga no eléctrodo pode estar associada a reações químicas homogéneas acopladas na solução, que podem anteceder ou seguir a reação de transferência eletrónica.

A existência de uma reação química após o passo de transferência eletrónica (*Electrochemical-Chemical* – EC) influencia o voltamograma cíclico. Neste caso, verifica-se um desvio do pico de redução para valores menos negativos que pode levar ao desaparecimento do pico reverso, em consequência da remoção da espécie pela reação química subsequente em solução. Este deslocamento pode estar diretamente relacionado com a cinética da reação [256]. As condições necessárias para se verificar um reação EC são [256]:

$$\left| \begin{array}{l} I_p / v^{1/2} \text{ decresce ligeiramente com o aumento de } v \\ E_{pc} \text{ é mais positivo do que } E^0 \\ | I_{pa} / I_{pc} | > 1 \text{ e aumenta com o aumento de } v \end{array} \right.$$

Se a reação homogénea acoplada ocorrer antes da transferência eletrónica (*Chemical-Electrochemical* – CE) os voltamogramas cíclicos também sofrem alterações [245].

1.4.2.2 Técnicas de degrau e impulso

Um degrau de potencial (ou impulso) aplicado representa uma alteração instantânea no sistema eletroquímico. A análise da evolução do sistema depois desta perturbação permite fazer deduções sobre as reações de eléctrodo e as suas velocidades.

O degrau de potencial é a base da voltametria de impulsos. A ideia principal no desenvolvimento das técnicas de impulso diferencial é a de minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total registada. Após a aplicação de um impulso de potencial a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradaica, deste modo a corrente é medida perto do fim do impulso.

Estes métodos são bastante úteis para elucidar processos de eléctrodo devido ao aumento da sensibilidade e apresentam melhores características para aplicações analíticas [245].

Voltametria de impulso diferencial

A voltametria de impulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry - DPV*) consiste na aplicação de pequenos impulsos de potencial sucessivos, de amplitude ΔE_p (amplitude de impulso), em intervalos periódicos de tempo τ , sobre uma rampa ou escada de potencial com degrau de ΔE_s .

As medições de corrente são efetuadas imediatamente antes da aplicação do impulso (I_1) e depois da aplicação do impulso (I_2), **Figura 1.20A**, que representa o tipo de onda de potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho. A diferença entre estas duas correntes é o valor de corrente registado num voltamograma de impulso diferencial, **Figura 1.20B** [245].

O tempo τ , durante o qual o impulso de potencial é aplicado define a *largura do impulso*. O tempo τ é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s , a velocidade de varrimento $\nu = \tau \Delta E_s$. Nesta técnica a velocidade de varrimento efetiva varia normalmente entre 1 e 10 mV s⁻¹ [245].

Como a voltametria de DP é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, ou seja, um pico. O potencial do

pico, E_p , pode ser identificado aproximadamente com $E_{1/2}$. Com o aumento da irreversibilidade do sistema, E_p afasta-se de $E_{1/2}$ (sistema reversível), simultaneamente aumenta a largura do pico e a sua altura diminui [245].

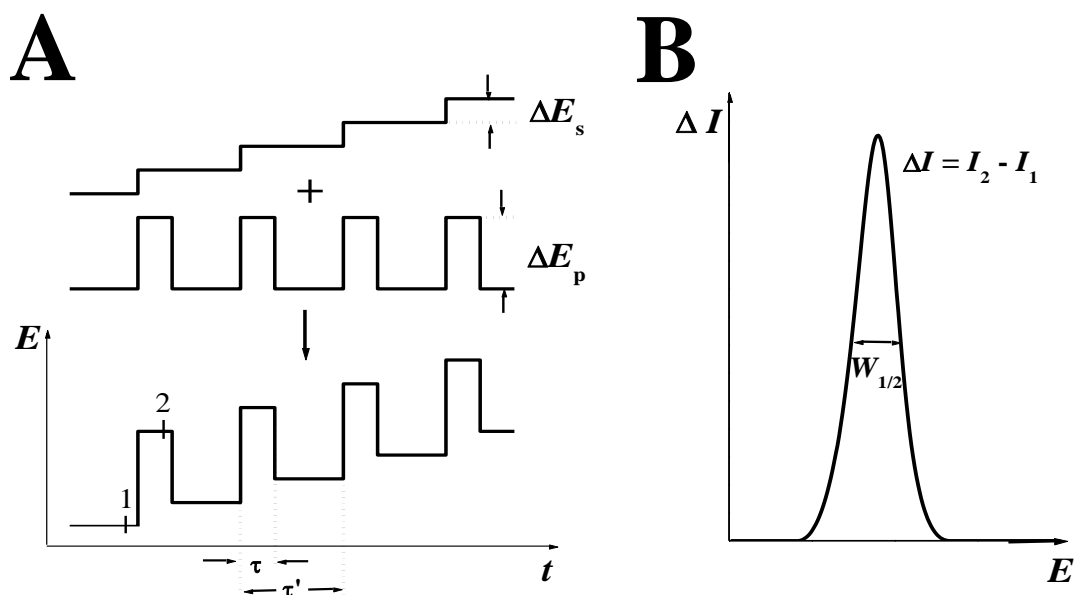


Figura 1.20 (A) Esquema da aplicação de potenciais em voltametria de DP; (B) Voltamograma I vs. E típico de voltametria de DP [244].

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

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

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

o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. [245]. A intensidade do pico de corrente I_p é proporcional à concentração do analito, mas depende da velocidade da reação eletroquímica.

Voltametria de onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry* - SWV) a forma da onda gerada resulta da adição de uma onda quadrada de amplitude de impulso ΔE_p a uma escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s , e com um período τ . O tipo de onda de potencial gerado para um sistema reversível está representado na **Figura 1.22**.

Na construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eletrodo durante metade do ciclo a que se segue, na restante metade, aplica-se um impulso de potencial negativo [245].

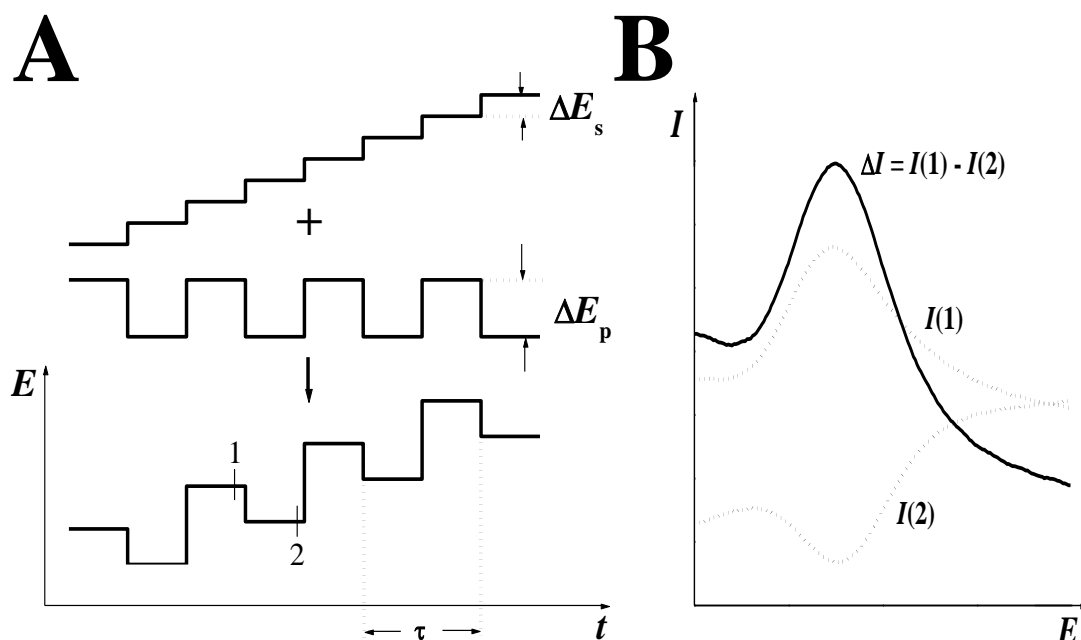


Figura 1.21 (A) Esquema da aplicação de potenciais em voltametria de SW; (B) Voltamograma I vs. E típico de voltametria de SW [244].

As medições realizam-se antes do fim de ambos os impulsos, positivo e negativo, após cada metade de ciclo. A corrente total, ΔI ou I_t que é registada, corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial direto – corrente direta (*forward current* - I_f), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – corrente inversa (*backward current* - I_b), logo $I(2)$ possui sinal

contrário a $I(1)$. Daqui resulta que, para sistemas reversíveis, $\Delta I = I(1) - I(2)$ e é maior do que $I(1)$, **Figura 1.21** [245].

A subtração das correntes direta e inversa permite realizar determinações eletroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra, uma vez que é possível remover a corrente resultante da redução do oxigênio dissolvido, tornando a análise mais rápida e menos dispendiosa [245].

Este tipo de amostragem e tratamento da corrente é responsável pelo aumento da sensibilidade apresentado por esta técnica, relativamente à voltametria de DP, no caso de sistemas reversíveis.

Outro aspeto importante está relacionado com a velocidade de varrimento, enquanto outras técnicas funcionam com velocidades de varrimento efetivas entre 1 e 10 mV s^{-1} , a voltametria de SW pode alcançar 1 V s^{-1} . As vantagens são a maior velocidade na análise que leva a um menor consumo de espécies eletroativas relativamente à voltametria de DP e, deste modo, reduz os problemas relacionados com o bloqueamento da superfície do elétrodo. A velocidade efetiva, v_{ef} , é calculada pela expressão $v_{ef} = \Delta E_s \times f$. Sendo assim, tempos experimentais muito curtos podem ser obtidos utilizando-se frequências moderadas, de maneira que os dados obtidos possam oferecer informações sobre a cinética do processo eletrónico.

1.4.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Recentemente a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy* - EIS) tem sido muito referenciada e aplicada nos estudos de sistemas eletroquímicos. [244,245,250,251,255,257]. A EIS envolve a aplicação de uma pequena perturbação ao sistema em eletroquímico, enquanto nos métodos voltamétricos, baseados em varrimento de degrau de potencial, o

sistema é perturbado longe do equilíbrio. A resposta à perturbação aplicada no EIS, que é geralmente sinusoidal, podendo diferir em fase e amplitude do sinal aplicado. A medição da diferença de fase e de amplitude (impedância) permite a análise do processo de eletrodo relativamente às contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogêneas acopladas, etc. A EIS tem importantes aplicações nos estudos de corrosão, de membranas, de sólidos iônicos, de eletrólitos sólidos, de polímeros condutores e de interface líquido/líquido. As informações recolhidas a partir dos dados de impedância podem ser analisadas através de diferentes métodos, sendo o mais usual o uso de circuitos elétricos análogos ou circuitos equivalentes.

A aplicação de circuitos equivalentes tem como base as semelhanças entre o comportamento eletroquímico e um circuito elétrico, composto tipicamente por resistências e capacitâncias, e a maioria dos fenómenos estudados em eletroquímica ocorre em regiões de frequências bem determinadas, baixas e altas, compreendidas entre 0,01 – 100 kHz.

Para um processo de eletrodo simples as combinações usadas normalmente para reações faradaicas incluem: uma componente que representa o transporte por difusão, uma componente que representa a cinética e uma componente que representa a capacidade da dupla camada. Considerando a aplicação de um sinal perturbador sinusoidal da forma:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t)$$

onde ω representa a frequência da perturbação (rad s^{-1}). A resposta é:

$$I(t) = \frac{E_0}{|Z|} \sin(\omega t + \varphi)$$

onde φ é o ângulo de fase entre a perturbação e a resposta. O fator de proporcionalidade, Z , entre a perturbação e a resposta é definido como a impedância elétrica de um sistema.

No caso de uma resistência pura, R , a resposta do sistema é dada pela lei de Ohm:

$$I(t) = \frac{E(t)}{R} = \frac{E_0}{R} \sin(\omega t)$$

A impedância é caracterizada pela amplitude e ângulo de fase e pode ser descrita da seguinte forma:

$$Z = Z' + iZ''$$

$$Z' = (E_0 / I_0) \cos \varphi$$

$$Z'' = (E_0 / I_0) \sin \varphi$$

e então:

$$\{ (Z')^2 + (Z'')^2 \}^{1/2} = |Z| = E_0 / I_0$$

Desta forma, qualquer célula eletroquímica pode ser representada em termos de um circuito elétrico equivalente, designado por circuito de Randles [245], **Figura 1.22**.

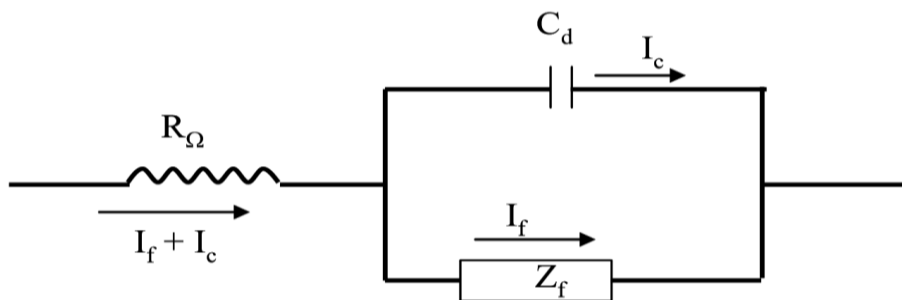


Figura 1.22 Circuito elétrico equivalente de uma célula eletroquímica para um processo de eletrodo simples [245].

O circuito de Randles inclui os seguintes parâmetros:

- a dupla camada: um condensador de capacidade C_d
- a impedância do processo faradaico Z_f
- a resistência não compensada, R_Ω , que é a resistência da solução entre os eletrodos de trabalho e de referência.

A impedância Z_f pode ser subdividida em dois modos equivalentes:

- uma resistência, R_s , em série com uma pseudo-capacitância, C_s .

- uma resistência de transferência de carga, R_{ct} , e uma impedância que mede a dificuldade de transporte de massa das espécies eletroativas, chamada de impedância de Warburg, Z_w .

A forma mais comum de representação dos dados é o diagrama em plano complexo, onde se representa Z' em função de Z'' . Uma alternativa de representação é o diagrama de Bode onde se representa $\log |Z|$ ou φ vs. $\log(\omega)$.

Para o circuito equivalente de Randles completo de uma reação de transferência de carga simples, separando os componentes de impedância em fase e fora de fase, pode mostrar-se que:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_d + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

$$-Z'' = \frac{\omega C_d (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma^2 C_d + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_d + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2}$$

Estes componentes estão representados por um gráfico no plano complexo na **Figura 1.23**, denominado gráfico de Sluyters ou Cole-Cole. As duas formas-limite destas equações são:

1. $\omega \rightarrow 0$

$$Z' = R_{\Omega} + R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}$$

$$Z'' = -\sigma\omega^{-1/2} - 2\sigma^2 C_d$$

Este limite de baixa frequência é uma linha reta de inclinação unidade, que extrapolada para o eixo real, dá uma interceção de $(R_{\Omega} + R_{ct} - 2\sigma^2 C_d)$. A linha corresponde a uma reação controlada somente por difusão, e a impedância é a impedância de Warburg, sendo o angulo de fase $\pi/4$.

2. $\omega \rightarrow \infty$

No limite de altas frequências, o controle é puramente cinético e $R_{ct} \gg Z_W$.

A analogia elétrica é uma combinação paralela RC . Assim as equações tornam-se:

$$Z = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2}$$

$$Z' = - \frac{\omega^2 C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2}$$

Na região de altas frequências a componente real da impedância tende a R_{Ω} , enquanto nas regiões de baixa frequência tende a $R_{\Omega} + R_{ct}$. Este comportamento permite obter informações sobre a resistência da célula à transferência de carga, na região de altas frequências e na região de baixas frequências.

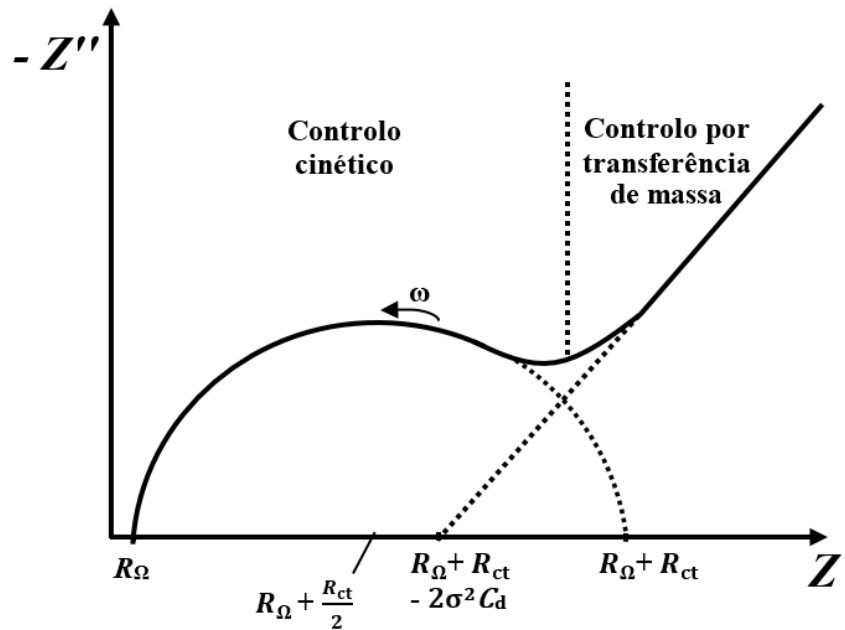


Figura 1.23 Gráfico de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico simples [245].

Eliminando a frequência nas expressões anteriores obtém-se a relação entre a componente imaginária e a componente real da impedância:

$$\left(Z' - R_{\Omega} - \frac{R_{ct}}{2} \right)^2 + (Z'')^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2$$

Esta expressão representa graficamente um círculo de raio $R_{ct} / 2$ com intersecção no eixo dos Z' de R_{Ω} ($\omega \rightarrow \infty$) e de $R_{\Omega} + R_{ct}$ ($\omega \rightarrow 0$).

Neste contexto, a representação gráfica da componente imaginária da impedância Z'' , vs. a componente real da impedância Z' pode fornecer informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância total do sistema.

A EIS é um método utilizado para obter informação relativa às modificações que ocorrem na dupla camada eletrolítica durante a adsorção de várias espécies. Devido ao ordenamento das cargas elétricas na superfície do eletrodo, a dupla camada eletrolítica é comparável a um condensador clássico de placas paralelas cuja capacitância é dada por:

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d}$$

onde ϵ_0 é a permissividade de vácuo, ϵ_r a permissividade relativa, A a área de superfície do eletrodo e d a largura da dupla camada. Sendo assim, as medições de impedância fornecem informações sobre a permissividade do meio dielétrico formado à superfície do eletrodo após a adsorção da respetiva substância, tal como sobre a largura da dupla camada eletrolítica.

A rugosidade e a porosidade, características de eletrodos sólidos, dão lugar ao chamado elemento de fase constante (CPE). Em sistemas reais, o CPE manifesta-se como um condensador não-ideal; no caso de uma interface bloqueada este elemento é descrito por:

$$Q_{CPE} = b(i\omega C)^\alpha$$

onde b é uma constante de proporcionalidade. Está demonstrado que para eletrodos porosos, o parâmetro de rugosidade é $\alpha = 0,5$ e para eletrodos lisos é $\alpha = 1$.

1.4.4 Microbalança de cristal de quartzo

A microbalança de cristal de quartzo (*Quartz Crystal Microbalance – QCM*) é um instrumento composto por transdutores piezoelétricos e um circuito oscilador, que acoplado a um sistema de medição permite obter variações de massa na escala de nanogramas, o que corresponde a estudar variações de desadsorção e adsorção de monocamadas de filmes ultrafinos ou de moléculas.

O princípio de funcionamento da QCM tem como base o efeito piezoelétrico dos seus cristais. Alguns minerais, nomeadamente o quartzo, respondem às perturbações mecânicas com a geração de um campo elétrico. O efeito contrário também ocorre, desta forma, quando se aplica uma diferença de potencial elétrico nas faces do cristal, este responde através da deformação da sua estrutura, que dependerá exclusivamente do sentido do campo elétrico. Este fenómeno é denominado de piezoelectricidade ou electricidade por pressão.

A QCM pode ser descrita como um sistema composto por um circuito eletrónico oscilador acoplado a um disco de cristal de quartzo, em que nas faces estão depositados filmes condutores, geralmente ouro. Na **Figura 1.24** está representado o esquema de um modelo de cristal de quartzo e filme metálico semelhante ao que foi utilizado neste trabalho.

A frequência de oscilação do cristal depende parcialmente da sua espessura e, em condições normais de funcionamento, pode considerar-se que todas as outras variáveis que influenciam o sistema permanecem constantes. Por conseguinte, uma alteração na espessura do cristal poderá ser relacionada com uma mudança de frequência

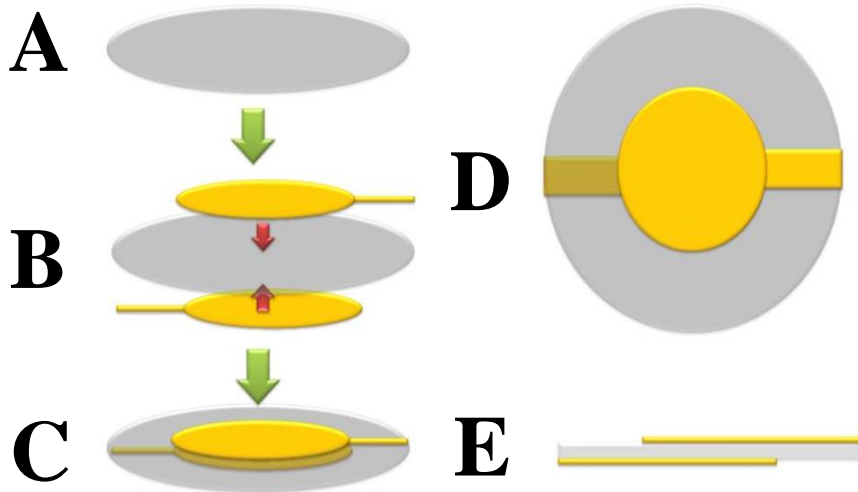


Figura 1.24 Representação do cristal da microbalança de cristal de quartzo (QCM), (A) disco de cristal de quartzo; (B) deposição do filme metálico sobre as faces do cristal; (C) cristal revestido pelos filmes metálicos; (D) vista superior do cristal e (E) secção transversal do cristal.

A análise da variação da espessura do cristal com a frequência foi efetuada por Sauerbrey e relaciona as alterações de frequência de ressonância do cristal com a variação de massa rígida acoplada na superfície de elétrodos através da equação [258]:

$$\Delta f = -2 \frac{f_0^2}{A\sqrt{\mu\rho}} \Delta m$$

onde f_0 é a frequência de ressonância do cristal (Hz), Δf é a variação de frequência (Hz), Δm é a variação de massa (g), A é a área piezoelétrica (cm^2), ρ a densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^3$) e μ é o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo corte AT = $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Considerando a equação, um aumento de massa à superfície do elétrodo resulta na diminuição da frequência do cristal de quartzo. É possível correlacionar as variações de frequência de um sistema que opera com amplitudes constantes, com as variações de massa referentes.

A QCM acoplada às técnicas eletroquímicas é denominada de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM), **Figura 1.25**. As medidas gravimétricas com recurso à EQCM são muito sensíveis, e permitem detetar *in situ* alterações de massa na ordem 1 ng cm^{-2} . A elevada sensibilidade e o facto de permitir obter informação *in situ* representa a maior vantagem da técnica EQCM, **Figura 1.25**.

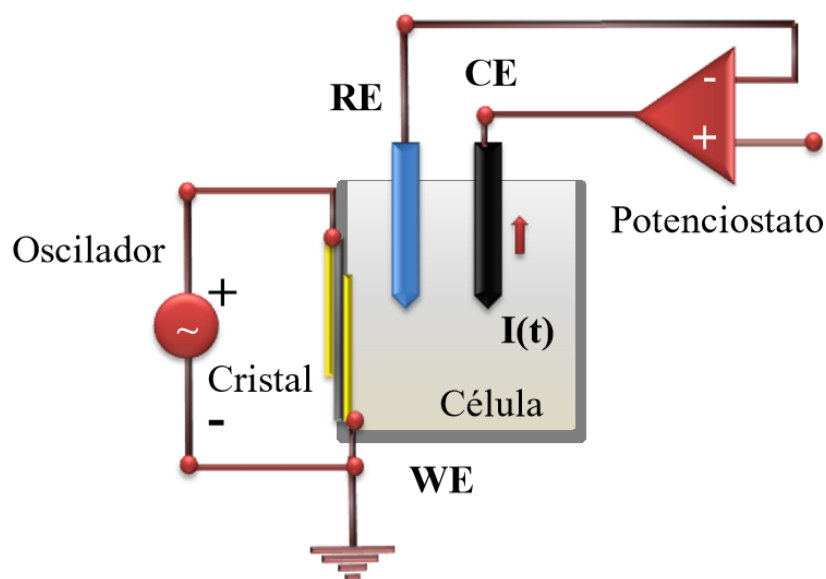


Figura 1.25 Modelo esquemático da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM). A QCM está ligada ao potenciostato imerso na célula eletroquímica com os eletrodos de trabalho (WE), eletrodo de referência (RE) e contra eletrodo (CE).

Nos últimos anos a QCM tem constituído um instrumento valioso no meio científico pelo facto de se poder aplicar a estudos de processos físicos e químicos que ocorrem nas superfícies, permite realizar experiências *in situ* e obter resultados em tempo real [259,260]. A técnica é muito versátil e pode ser associada a outras técnicas óticas e de estudo de superfícies. A EQCM torna-se numa ferramenta muito útil porque permite obter simultaneamente informações acerca dos parâmetros eletroquímicos e alterações de massa que ocorrem na superfície do eletrodo, ou seja, permite estudar fenómenos eletroquímicos e o desenvolvimento de novos sensores [259,260].

CAPÍTULO 2

Experimental

Neste capítulo apresenta-se uma descrição dos reagentes, soluções, métodos de investigação, instrumentação eletroquímica, tratamento dos dados e condições experimentais utilizadas ao longo deste trabalho, no estudo eletroquímico das moléculas descritas no capítulo anterior, por voltametria cíclica, voltametria de impulso diferencial (DP) e voltametria de onda quadrada (SW) espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e microbalança de cristais de quartzo (QCM).

2.1 Reagentes e soluções

A solução mãe de CaM e a solução mãe de colesterol, **Tabela 2.1**, foram preparadas em água Milli-Q. Após a preparação das soluções mãe, as mesmas foram guardadas a 4°C até à sua utilização. As proteínas CAV-1, CAV-2 e CAV-3 foram utilizadas sem qualquer tratamento, **Tabela 2.1**.

Os derivados da isatina (ISA) analisados neste trabalho estão apresentados na **Tabela 2.2**. Os derivados da ISA foram todos sintetizados e purificados pelo grupo do Professor Dr. Ângelo C. Pinto, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil [261–270], e foram utilizados sem purificação adicional. As soluções mãe de todos os derivados analisados foram preparadas em etanol e guardadas a 4°C até à sua utilização.

Tabela 2.1 Derivados da ISA analisados e as suas abreviaturas.

Derivados da Isatina	Abreviatura
Isatina	ISA
Isatina-3-hidrazona	HIDISA
7-metilisatina-3-hidrazona	7-CH ₃ -HIDISA
Isatina-3-semicarbazona	SEMISA
Isatina-3-tiosemicarbazona	TIOSEMISA
5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona	5-Br-TIOSEMISA
5-nitroisatina	5-NO ₂ -ISA
5-fluorisatina	5-F-ISA
5-cloroisatina	5-Cl-ISA
5-bromoisatina	5-Br-ISA
5-iodoisatina	5-I-ISA
7-cloroisatina	7-Cl-ISA
7-iodoisatina	7-I-ISA
4,6-(dibromo)isatina	4,6-diBr-ISA
5,7-(dicloro)isatina	5,7-diCl-ISA
5,7-(dibromo)isatina	5,7-diBr-ISA
5,7-(fluorcloro)isatina	5,7-FCl-ISA
5,7-(bromocloro)isatina	5,7-BrCl-ISA
1-morfolinoisatina	NMORF-ISA
1,5-(morfolinoiodo)isatina	NMORF-5I-ISA
1,5-(morfolinoflúor)isatina	NMOR-5F-ISA
1,5-(morfolinobromo)isatina	NMORF-5Br-ISA
1,6-(morfolinoflúor)isatina	NMORF-6F-ISA
1-(hidroxi)isatina	NCOHISA
1,5-(hidroxibromo)isatina	NCOH-5Br-ISA
1-metilisatina	N-CH ₃ -ISA
1,5-(metilcloro)isatina	NMe-5Cl-ISA
5-metilisatina	5-CH ₃ -ISA
7-metilisatina	7-CH ₃ -MeISA
5,7-(clorometil)isatina	5,7-ClMeISA
3-(hidroxi)isatina	3-OH-ISA

Tabela 2.2 Compostos e respectivas concentrações das soluções utilizadas.

Compostos	Abreviatura	Concentração	Proveniência
Calmodulina	CaM	60 μM	Genaxxon
Caveolina 1	CAV-1	0,05 mg mL^{-1}	Abcam
Caveolina 2	CAV-2	0,05 mg mL^{-1}	Abcam
Caveolina 3	CAV-3	0,05 mg mL^{-1}	Abcam
Ureia	-	6 M	Sigma
Ditiotritol	DTT	10 mM	Sigma
Dodecil sulfato de sódio	SDS	50 mM	Sigma
Tris-(2-carboxietil)-fosfina	TCEP	50 mM	Sigma
Hidrocloreto de guanidina	GuaHCl	6 M	Sigma
Colesterol	Col	10 mM	Aldrich

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de pureza analítica, utilizando água (condutividade $<0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) purificada pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França. As soluções de eletrólito inerte de diferentes valores de pH, com força iônica igual a 0,1 M foram preparadas de acordo com a **Tabela 2.3**.

As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas em cada capítulo e foram preparadas diretamente na célula eletroquímica, por diluição da respectiva solução mãe do composto de interesse, no eletrólito inerte desejado. Os eletrólitos inertes utilizados estão referidos no texto. Existem procedimentos experimentais específicos que se encontram descritos nos respectivos capítulos. Nos estudos efetuados com as proteínas CaM, CAV-1, CAV-2 e CAV-3, o eletrólito inerte utilizado foi pH = 7,0 tampão (Tris/HCL) 0,1M.

As soluções saturadas com N₂ foram preparadas através da passagem de um fluxo de gás N₂ de elevada pureza sobre as soluções, durante 10 minutos antes do início da medida voltamétrica e mantido à superfície da solução durante as medições.

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

Para dosear os nano e os micro-volumes de solução preparados e utilizados ao longo das experiências, foram utilizadas pipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P20 da Gilson S.A., Villiers-le-Bel, França.

Todas as experiências foram feitas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Tabela 2.3 Composição das soluções de eletrólito inerte [271].

Eletrólitos inertes (diluições para 100mL)	pH
0,2 M KCl + 0,2M HCl	1,2
0,2 M KCl + 0,2M HCl	2,0
0,2 M NaAcO + 0,2M HAcO	3,4
1 M NaAcO + 1 M HAcO	4,5
0,2 M NaAcO + 0,2M HAcO	5,4
0,2 M Na ₂ HPO ₄ + 0,2M NaH ₂ PO ₄	6,1
0,2 M Na ₂ HPO ₄ + 0,2M NaH ₂ PO ₄	7,0
0,2 M Na ₂ HPO ₄ + 0,2M NaH ₂ PO ₄	8,0
0,025M Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O + 0,1 M NaOH	9,2
0,2 M KCl + 0,2M NaOH	12,0
0,2 M KCl + 0,2M HCl	12,8

2.2 Instrumentação

Todas as experiências de voltametria foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab da Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, Figura 2.1, funcionando no modo potenciostático.



Figura 2.1 Potenciostato/galvanostato Autolab.

O controlo dos parâmetros utilizados durante os ensaios de EIS, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram efetuados por intermédio do programa FRA (*Frequency Response Analyser*) versão 4.9, da Eco-Chemie, Utrecht, Holanda. Durante o registo dos espectros de impedância foi aplicado um sinal perturbador de amplitude 5 mV num intervalo de frequências 100 kHz a 0,1 Hz, enquanto o potencial aplicado foi mantido constante a + 0,5 V.

Os estudos gravimétricos realizados neste trabalho foram efetuados utilizando uma QCM, integrada numa plataforma AWS A20, com um cristal de quartzo coberto com ouro em ambas as faces e revestido a grafite (AuQC_Gr) com frequência de ressonância de 9 MHz, a funcionar com o programa A20RPSOft da AWSensors, Scientific Technology, Valencia, Spain. A célula integrada na plataforma AWS A20 está acoplada a um computador controlado por SP-200 Research Grade

Potentiostat/Galvanostat/FRA a funcionar com o programa EC-Lab V10.40, da Bio-Logic Science Instruments SAS, Claix, France.

As experiências espectrofotométricas foram registadas num espectrofotómetro UV-Vis SPECORD S100, associado ao programa Aspect Plus, versão 1.5 da Analytic Jena GmbH, Jena, Alemanha. Foram utilizadas cuvetes de quartzo com percurso óptico de 1 cm. As condições experimentais foram: tempo de integração 25 ms e uma acumulação de 1000 pontos para cada medida registada. Todos os espectros foram realizados na gama de comprimentos de onda de 190 a 400 nm.

Todas as experiências eletroquímicas de voltametria foram realizadas numa célula eletroquímica, **Figura 2.2**, de capacidade máxima 3 mL. O eléctrodo de trabalho utilizado foi um eléctrodo de carbono vítreo (GCE) de diâmetro $\Phi = 1\text{mm}$, da BAS Inc., Tóquio. O eléctrodo auxiliar foi um fio de platina (Pt) e o eléctrodo de referência foi o eléctrodo Ag/AgCl (3M KCl), da Cypress System Inc., EUA, **Figura 2.2**.



Figura 2.2 Célula eletroquímica e eléctrodos utilizados nos estudos eletroquímicos.

No tratamento dos dados e na construção dos gráficos apresentados ao longo deste trabalho foi utilizada o programa Origin®, versão 8.0, da Microcal Software, Inc., EUA. O algoritmo de *Savitsky-Golay* foi utilizado sempre que houve necessidade de eliminar ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

As estruturas químicas das substâncias e todos os mecanismos apresentados foram desenhados com o programa ChemDraw Ultra, versão 8.0, da CambridgeSoft Corporation, EUA.

2.3 Parâmetros voltamétricos

O controlo dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados experimentais foram efetuados por intermédio do programa GPES (General Purpose Electrochemical System), versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda.

Para as medidas de voltametria cíclica foi sempre utilizado um degrau de potencial de $\Delta E_s = 2$ mV. Em todas as medidas realizadas por voltametria de DP foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: largura do impulso 70 ms, amplitude de impulso 50 mV e velocidade de varrimento $v = 5$ mV s⁻¹. Os voltamogramas de DP foram sujeitos à correção da linha de base através do algoritmo matemático *moving average*, utilizando um degrau de 1 mV.

Nas medidas realizadas por voltametria de SW foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: a amplitude de pulso 50 mV, o degrau de potencial a $\Delta E_s = 2$ mV. A frequência do impulso foi modificada de acordo com a necessidade de cada experiência.

2.4 Preparação da superfície dos eletrodos

Antes de cada experiência, o GCE, o eletrodo de trabalho utilizado nas medidas voltamétricas, foi sujeito a um tratamento mecânico e eletroquímico com o objetivo de limpar a sua superfície. A limpeza mecânica do GCE envolve o polimento com *spray* de grão de diamante com partículas de diâmetro 1 μm , da Kemet International Ltd, Reino Unido. Depois do polimento, o eletrodo foi lavado com um jato de água Milli-Q.

Após a limpeza mecânica foi efetuado o condicionamento eletroquímico da superfície do GCE através do registo de vários voltamogramas de DP ou voltamogramas cíclicos na solução de eletrólito inerte, até se verificar uma resposta eletroquímica estável e inalterável que comprova a limpeza da sua superfície.

A medição voltamétrica das espécies em estudo realizou-se depois da limpeza da eletrodo. A escolha do eletrólito inerte e a concentração da solução foi estudada para cada caso. Depois de cada varrimento registado limpou-se a superfície do GCE para retirar todo o composto eventualmente adsorvido, ou os possíveis produtos de oxidação das espécies em estudo, de maneira a não interferir com os varrimentos seguintes.

A superfície do cristal utilizado nas medidas gravimétricas foi lavado com água desionizada e seco com um fluxo de gás N_2 de elevada pureza. Depois de cada medida efetuada, a superfície do cristal foi limpa com etanol para retirar os resíduos de proteína adsorvida e de seguida foi passado por um jato de água Milli-Q.

2.4.1 *Modificação da superfície do GCE para desnaturação de proteínas*

O estudo da desnaturação das proteínas foi efetuado com a superfície do GCE modificada com um filme de proteína, obtido através da deposição de uma gota de 5 μL (filme monocamada) ou quatro gotas (filme multicamada), retiradas diretamente do

frasco de concentração 60 μM de CaM ou de CAV-2, com secagem sobre um fluxo constante de nitrogênio, entre cada gota adicionada.

Para proceder à investigação da oxidação da proteína desnaturada, depois de preparado o filme na superfície do eletrodo, o mesmo é incubado em eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão 0,1 M (Tris/HCl), que contém os agentes dodecil sulfato de sódio (SDS) 50 mM e os agentes redutores tris (2-carboxiletil) fosfina (TCEP) 50 mM e ditioneitol (DTT) 10 mM e ureia 6 M, para diferentes tempos de incubação. De seguida, o eletrodo é removido e lavado com um jato de água Milli Q, para remover o excesso de solução desnaturante, e colocado na célula eletroquímica que contém apenas eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M).

PRIMEIRA PARTE

COMPORTAMENTO REDOX DE MOLÉCULAS DERIVADAS DA ISATINA

CAPÍTULO 3

Estudo Voltamétrico de Derivados Nitrogenados da Isatina

Uma das principais áreas da investigação científica está ligada à síntese de novas substâncias químicas de interesse farmacêutico e ao desenvolvimento de medicamentos, com vista à prevenção de doenças e a melhorar a qualidade de vida. Neste contexto, o estudo das moléculas derivadas da isatina é essencial, uma vez que estes compostos estão envolvidos na síntese e constituição de substâncias químicas com interesse farmacêutico, sendo que alguns já fazem parte da constituição de medicamentos.

Neste capítulo é apresentado o estudo eletroquímico da ISA e de seis derivados nitrogenados da ISA, que contêm na sua estrutura um ou mais átomos de nitrogénio, e que foram agrupados em função do grupo substituinte [92]. Da série estudada fazem parte os derivados nitrogenados, 5-nitroisatina, isatina-3-hidrazona, 7-metilisatina-3-hidrazona, isatina-3-semicarbazona, isatina-3-tiosemicarbazona e 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona **Figura 3.1**.

As propriedades redox destas moléculas foram esclarecidas através da análise do comportamento eletroquímico da ISA e dos derivados nitrogenados, com recurso às técnicas de voltametria cíclica, de DP e de SW, utilizando o GCE, e os mecanismos de oxidação e redução propostos para estes derivados foram propostos, tendo em conta os resultados obtidos [92].

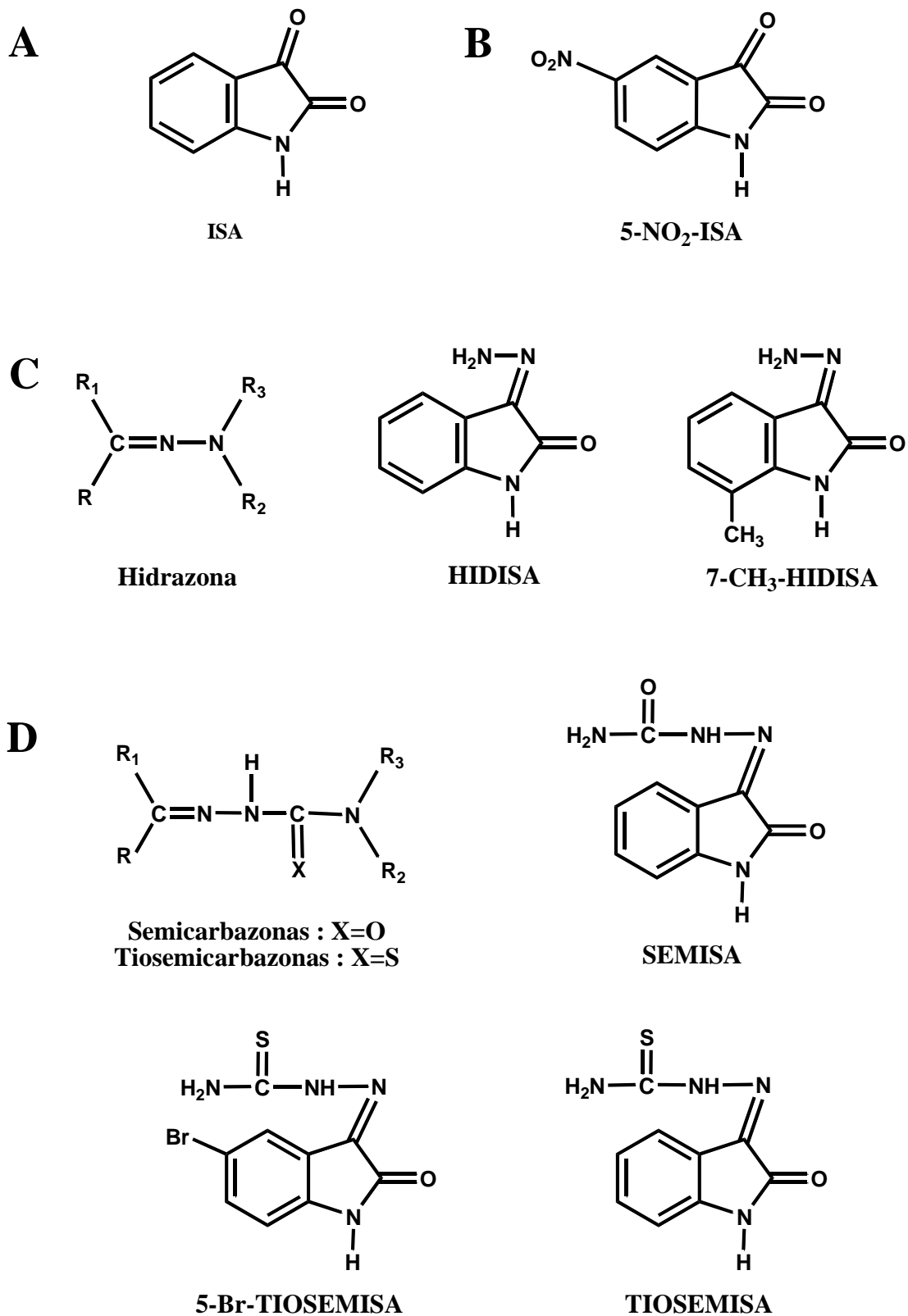


Figura 3.1 Estruturas químicas da (A) ISA e de derivados nitrogenados: (B) grupo funcional nitro, (C) grupo funcional hidrazona e (D) grupos funcionais semicarbazona e tiosemicarbazona.

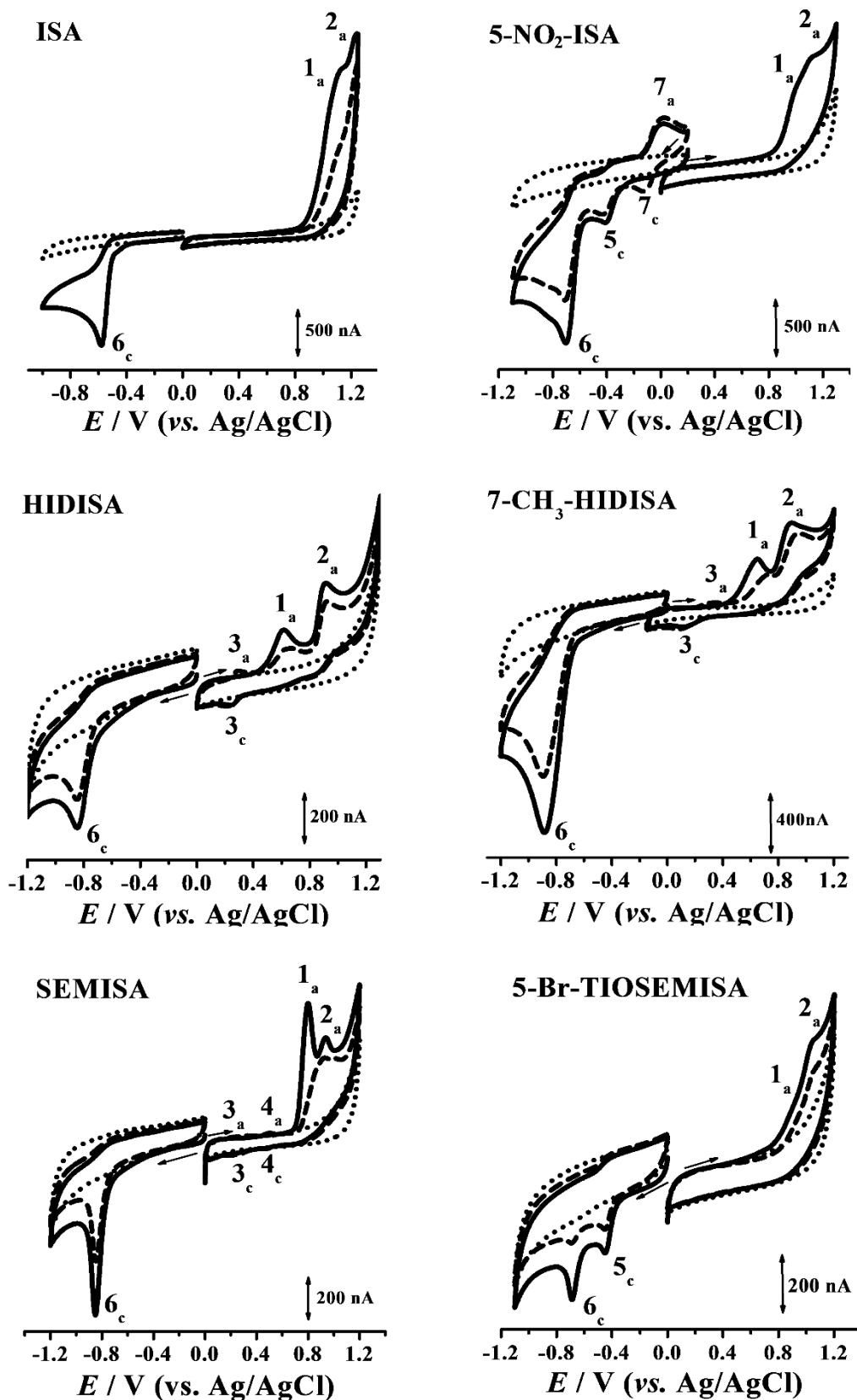


Figura 3.2 Voltamogramas cíclicos em (•••) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), em soluções de 500 μM ISA, 260 μM 5-N-ISA, 186 μM HIDISA, 260 μM 7-CH₃-HIDISA, 500 μM de SEMISA e 167 μM de 5-BrTIOSEMISA, (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 3.1 Potenciais de oxidação dos derivados nitrogenados da ISA obtidos por voltametria cíclica.

Derivados nitrogenados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)	
	1º Varrimento	2º Varrimento
ISA	$E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 1,16 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,20 \text{ V}$
5-NO ₂ -ISA	$E_{p1a} = + 0,98 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,10 \text{ V}$	— $E_{p2a} = + 1,10 \text{ V}$
HIDISA	$E_{p1a} = + 0,60 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,90 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,92 \text{ V}$ $E_{p3c} = + 0,25 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 0,28 \text{ V}$
7-CH ₃ -HIDISA	$E_{p1a} = + 0,64 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,90 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 0,70 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,93 \text{ V}$ $E_{p3c} = + 0,11 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 0,32 \text{ V}$
SEMISA	$E_{p1a} = + 0,80 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,94 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 0,90 \text{ V}$ $E_{p3c} = + 0,27 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 0,30 \text{ V}$ $E_{p4c} = + 0,46 \text{ V}$ $E_{p4a} = + 0,49 \text{ V}$
TIOSEMISA	$E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,86 \text{ V}$	— $E_{p2a} = + 0,90 \text{ V}$
5-Br-TIOSEMTISA	$E_{p1a} = + 0,86 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,05 \text{ V}$	— $E_{p2a} = + 0,90 \text{ V}$

O estudo inicial realizou-se por voltametria cíclica, com velocidade de varrimento $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, em soluções de concentração $\sim 200 \text{ }\mu\text{M}$, **Figura 3.2**, **Tabela 3.1**, preparadas diretamente em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$) e saturadas com N_2 de forma a evitar a difusão do oxigênio atmosférico para o interior das soluções. Todos os derivados nitrogenados analisados apresentaram comportamento eletroquímico no GCE, tendo-se verificado a existência de vários picos de oxidação e redução.

Uma vez que os processos de oxidação e redução apresentaram comportamentos independentes entre si, o estudo dos derivados nitrogenados da ISA foi realizado separadamente.

3.1 Oxidação eletroquímica

3.1.1 Voltametria cíclica

As experiências de voltametria cíclica realizaram-se no intervalo de potencial $0,0 \text{ V}$ até $1,3 \text{ V}$, em soluções de $500 \text{ }\mu\text{M}$ de ISA, **Figura 3.3**, $260 \text{ }\mu\text{M}$ de 5- NO_2 -ISA, **Figura 3.4**, $186 \text{ }\mu\text{M}$ de HIDISA, **Figura 3.5A**, $260 \text{ }\mu\text{M}$ de 7- CH_3 -HIDISA, **Figura 3.5B**, $500 \text{ }\mu\text{M}$ de SEMISA, **Figura 3.7A**, e $167 \text{ }\mu\text{M}$ de 5-Br-TIOSEMISA, **Figura 3.7B**, preparadas diretamente em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$) e os dados relativos aos potenciais dos picos de todos os derivados nitrogenados estão resumidos na **Tabela 3.1**.

3.1.1.1 Isatina

Os voltamogramas cíclicos realizados numa solução de $500 \text{ }\mu\text{M}$ de ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$), mostraram no primeiro varrimento o aparecimento de dois picos de oxidação irreversíveis, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$, **Figura 3.3**.

O potencial dos picos de oxidação da ISA deslocou-se para valores de potenciais mais positivos, próximo da evolução do oxigénio, quando comparado com os valores de potencial dos picos de oxidação dos seus derivados nitrogenados, como será descrito a seguir e resumido na **Tabela 3.1**.

Em varrimentos sucessivos, sem limpar o GCE, verificou-se que a intensidade da corrente para ambos os picos de oxidação da ISA diminuiu, devido à adsorção dos produtos de oxidação da ISA na superfície do GCE, que causam a diminuição da área na superfície do GCE disponível para a oxidação.

3.1.1.2 5-Nitroisatina (5-NO₂-ISA)

Nos voltamogramas cíclicos registados numa solução de 260 µM de 5-NO₂-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), observaram-se dois picos de oxidação irreversíveis, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,98$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,10$ V, **Figura 3.4**, mas com a intensidade de corrente muito baixa. Os potenciais dos picos de oxidação da 5-NO₂-ISA apresentaram valores mais positivos, **Tabela 3.1**, quando comparado com os potenciais dos outros derivados nitrogenados da ISA, que serão descritos a seguir.

3.1.1.3 Isatinas-hidrazonas (HIDISA)

Os voltamogramas cíclicos foram realizadas em soluções de 186 µM HIDISA e de 260 µM 7-CH₃-HIDISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M).

Para ambas as hidrazonas, ocorreram dois picos de oxidação irreversíveis e consecutivos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,60$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,90$ V, associados a processos eletroquímicos do grupo hidrazona das respetivas moléculas, **Figura 3.5**.

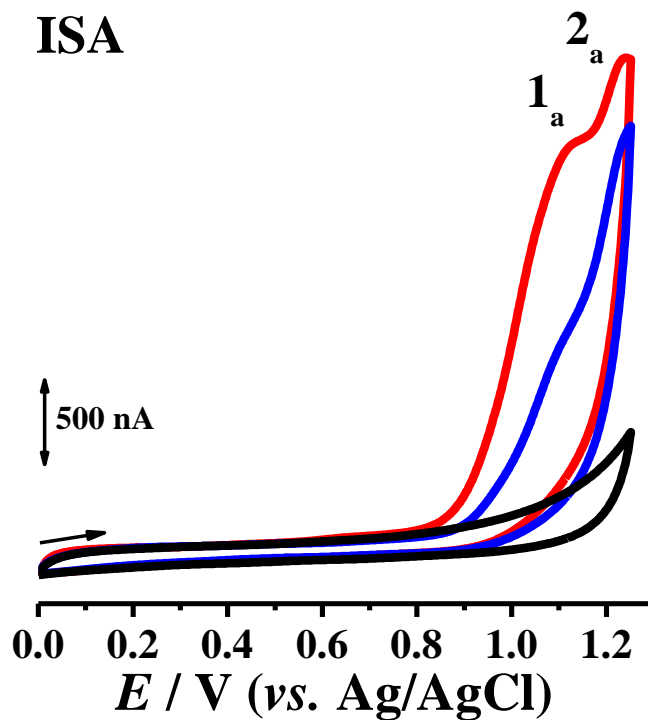


Figura 3.3 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e numa solução de 500 μM ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

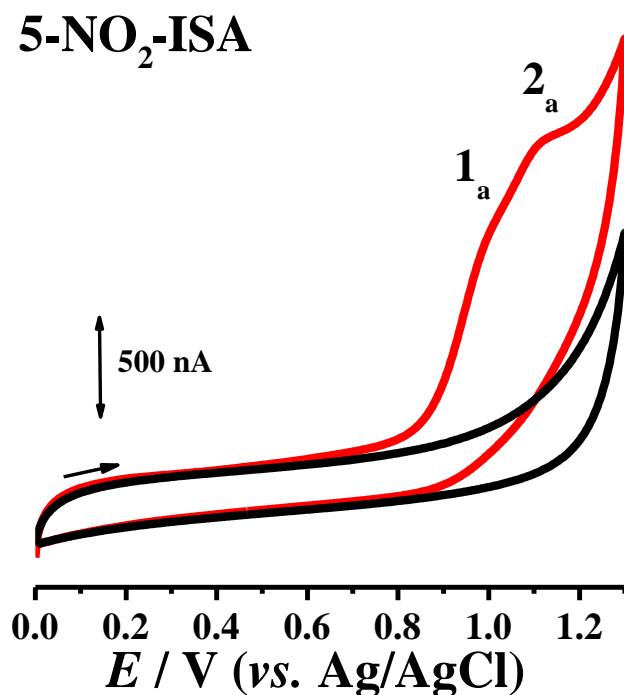


Figura 3.4 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), numa solução de 260 μM 5- NO_2 -ISA, (—) primeiro varrimento. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O sentido do varrimento foi invertido e, no sentido negativo dos potenciais, observou-se um pico catódico, pico 3c, a $E_{p3c} = + 0,25$ V, para a HIDISA, **Figura 3.5A**, e o pico 3c, a $E_{p3c} = + 0,11$ V, para a 7-CH₃-HIDISA, **Figura 3.5B**. O pico 3c corresponde à redução do produto de oxidação da HIDISA, formado na superfície do GCE no primeiro varrimento, no sentido positivo.

Num novo varrimento, realizado com o GCE limpo, inverteu-se o sentido do varrimento logo após o pico 1a, antes do pico 2a, e não se observou o pico 3c no varrimento inverso, o que significa que o produto de oxidação da HIDISA está associado aos produtos formados no pico 2a, o segundo processo de oxidação, que ocorre a um potencial de oxidação mais elevado, $E_{p2a} = 0,90$ V.

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

Considerando que para um sistema reversível, $|E_{pa} - E_{pc}| \sim 59 / n$ mV (a 25 °C), no segundo processo de oxidação da HIDISA estão envolvidos dois eletrões. Contudo, na oxidação da 7-CH₃-HIDISA, o pico 3a não é reversível, uma vez que a diferença entre os potenciais do pico de oxidação é $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 183$ mV, **Figura 3.5B**.

O estudo do efeito da variação da velocidade de varrimento na oxidação das isatinas-hidrazonas foi avaliado numa solução de 186 µM de HIDISA, para velocidades entre 10 e 1000 mV s⁻¹, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 3.6**.

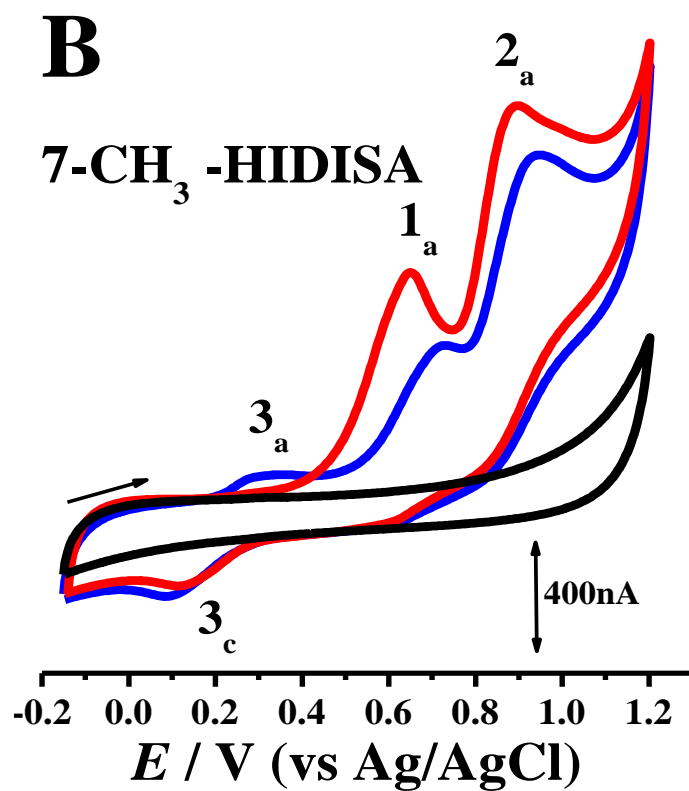
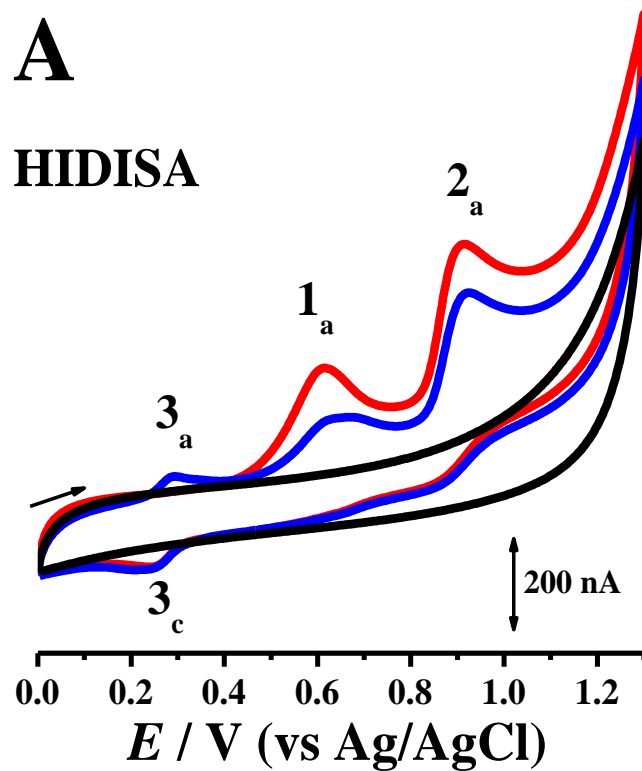


Figura 3.5 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e em solução de (A) 186 μ M HIDISA e (B) 260 μ M 7-CH₃-HIDISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

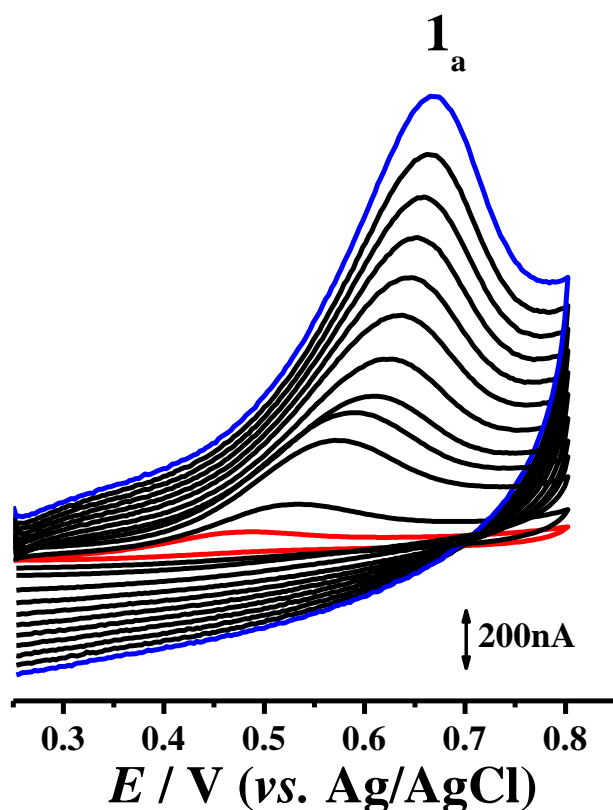


Figura 3.6 Voltamogramas cíclicos numa solução de 186 μM de HIDISA, em $\text{pH} = 7,0$ tampão fosfato 0,1 M, com velocidades de varrimento a variar de (—) 10 a (—) 1000 mV s^{-1} .

Os resultados demonstraram que a corrente de pico aumenta com o aumento da velocidade, mas o potencial de oxidação é deslocado 200 mV para valores mais positivos, e não se trata de um processo de oxidação irreversível controlado por difusão [245]. A relação I_{p1a} vs. \sqrt{v} não é linear e este tipo de comportamento é justificado devido à forte adsorção da HIDISA e/ou dos seus produtos de oxidação na superfície hidrofóbica do GCE, e está de acordo com o caráter altamente hidrofóbico da ISA [27,272].

3.1.1.4 Isatina-semicarbazona e Isatina-tiosemicarbazona

As experiências de voltametria cíclica foram efetuadas em soluções de 500 μM SEMISA e de 167 μM 5-Br-TIOSEMISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 3.7**.

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

O sentido do primeiro varrimento foi invertido na direção negativa, e observaram-se dois novos picos catódicos consecutivos, o pico 3c, a $E_{p3c} = + 0,27$ V, e o pico 4c, a $E_{p4c} = + 0,46$ V, reversíveis, uma vez que a partir do segundo varrimento, sem limpar o GCE, observaram-se dois novos picos de oxidação, os picos 3a e 4a, **Figura 3.7A e Tabela 3.1.**

Também se observou a diminuição de corrente dos picos 1a e 2a, devido à forte adsorção dos respectivos produtos de oxidação na superfície do GCE.

Nos voltamogramas cíclicos registados na solução de 5-Br-TIOSEMISA observaram-se também dois picos anódicos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,86$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,05$ V, contudo, depois de invertido o sentido do varrimento, não foram detetados quaisquer picos catódicos, indicativos de um processo de redução, **Figura 3.7B.**

No segundo varrimento também se observou a diminuição da corrente dos picos de oxidação, devido à adsorção dos produtos de oxidação na superfície do GCE e consequente diminuição da área do eletrodo, impedindo o processo de oxidação.

3.1.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

As experiências de voltametria de DP foram realizadas em soluções de ISA e de 5-NO₂-ISA eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M). A influência do pH na oxidação da ISA, da HIDISA e da SEMISA foi estudada numa gama de eletrólitos de força iónica 0,1 M, num intervalo de pH que variou entre 2,0 e 12,0, **Tabela 2.3.** Todas as experiências foram efetuadas usando sempre uma superfície limpa do GCE.

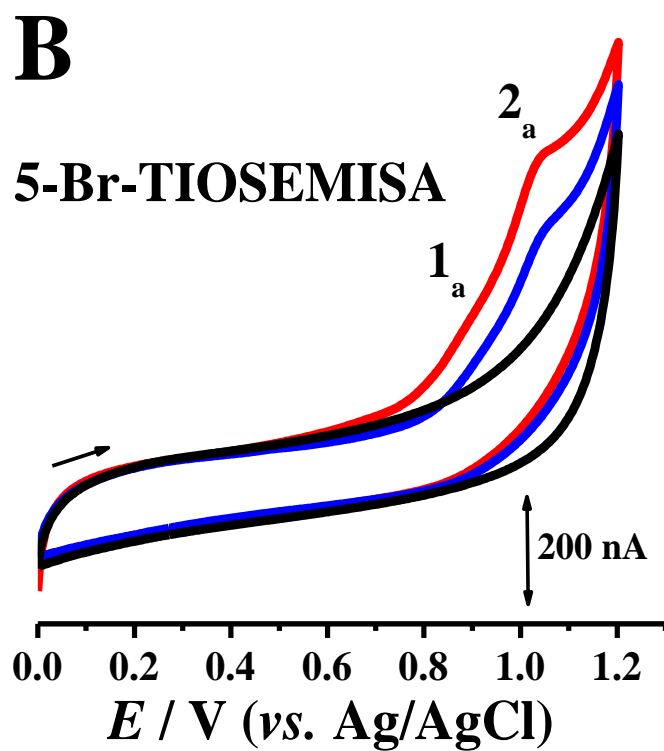
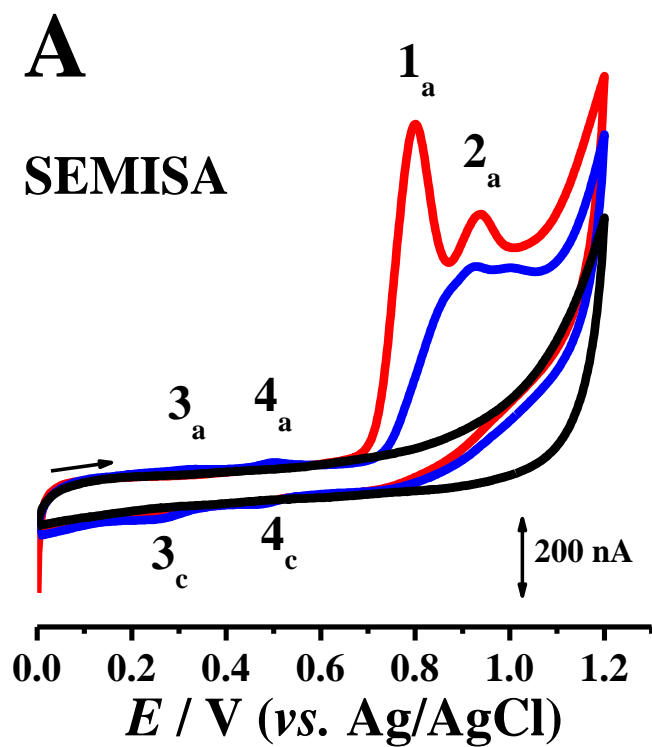


Figura 3.7 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em solução de (A) 500 μ M de SEMISA e (B) 167 μ M de 5-Br-TIOSEMISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

3.1.2.1 Isatina

Nos voltamogramas de DP efetuados numa solução de 20 μM de ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), observou-se que a oxidação da ISA ocorre em dois passos, com a formação dos picos 1a, a $E_{p1a} = + 0,96 \text{ V}$, e pico 2a, $E_{p2a} = + 1,20 \text{ V}$, **Figura 3.8**.

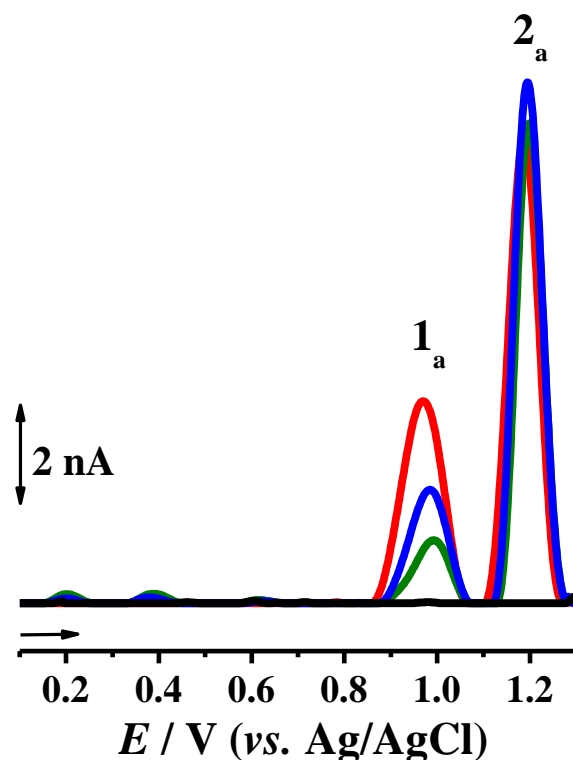


Figura 3.8 Voltamogramas de DP sucessivos, em eletrólito inerte a (—) $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), e numa solução de 20 μM de ISA, (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A influência do pH na oxidação da ISA foi avaliada no intervalo de pH da **Tabela 2.3**. Verificou-se que aumentando o pH , ocorre um deslocamento do potencial dos picos de oxidação 1a e 2a para valores mais negativos, seguindo a relação de 59 mV por unidade de pH , e nos mecanismos dos processos de oxidação ocorre a transferência do mesmo número de elétrons e prótons. Uma vez que a largura a meia altura do pico 1a é $W_{1/2} \approx 100 \text{ mV}$ e do pico 2a é $W_{1/2} \approx 90 \text{ mV}$, foi possível concluir que as duas reações eletroquímicas ocorrem com a transferência de um elétron e de um próton [27].

3.1.2.2 Isatina-3-hidrazona (HIDISA)

Os voltamogramas de DP foram registrados numa solução de 10 μM de HIDISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M). No primeiro varrimento, a oxidação da HIDISA ocorre em duas etapas, com a ocorrência dos picos de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,60 \text{ V}$, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,88 \text{ V}$, **Figura 3.9**.

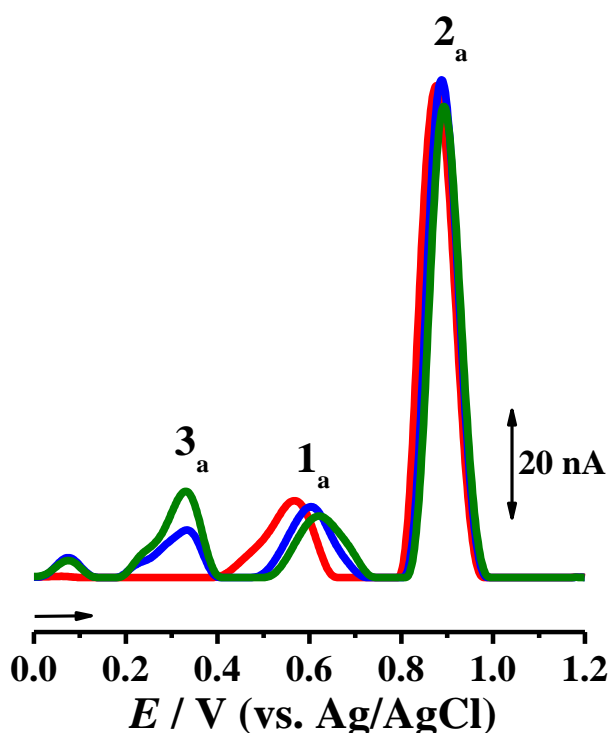


Figura 3.9 Voltamogramas sucessivos de DP numa solução de 10 μM de HIDISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Durante o segundo varrimento, sem limpar a superfície do GCE, observou-se a formação de um novo pico de oxidação, o pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,30 \text{ V}$, cuja intensidade de corrente aumenta com o número de varrimentos. Estes resultados estão de acordo com os resultados de voltametria cíclica, **Figura 3.5A**.

A adsorção da HIDISA na superfície do eletrodo foi estudada, efetuando vários varrimentos sucessivos de voltametria de DP na solução de 10 μM de

HIDISA em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), sem limpar a superfície do GCE. De seguida, o GCE com a HIDISA e o seu produto de oxidação adsorvido foi lavado com um jato de água Milli-Q e transferido de imediato para uma célula apenas com eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M). Nos voltamogramas de DP obtidos observou-se a presença dos picos de oxidação 1a, 2a e 3a, **Figura 3.10**(—).

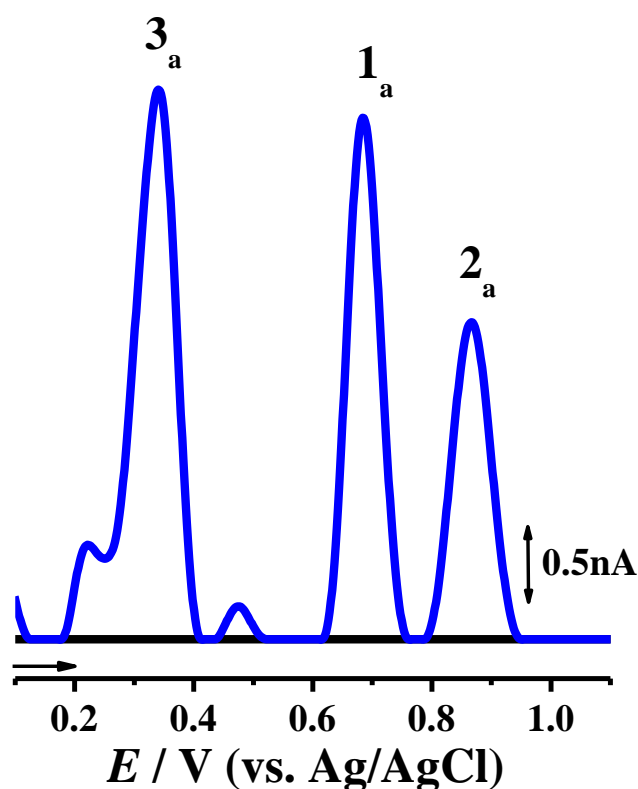


Figura 3.10 Voltamogramas de DP em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), obtidos no: (—) GCE limpo e (—) GCE com HIDISA e o seu produto de oxidação adsorvidos após quatro varrimentos sucessivos numa solução de 10 μM de HIDISA em eletrólito pH = 7,0. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A formação dos picos de oxidação 1a, 2a e 3a em eletrólito inerte, após varrimentos sucessivos numa solução de 10 μM de HIDISA, **Figura 3.10**, confirmou que tanto a HIDISA como os seus produtos de oxidação adsorvem fortemente na superfície do GCE. De facto, esta experiência veio confirmar o resultado do estudo da variação da velocidade de varrimento, efetuado por voltametria cíclica, que concluiu

que a relação I_{p1a} vs. \sqrt{v} não é linear, **Figura 3.6**, devido à forte adsorção da HIDISA e/ou dos seus produtos de oxidação na superfície do GCE.

Os voltamogramas de DP efetuados com o GCE em soluções de 10 μ M de HIDISA, **Figura 3.11**, em eletrólitos inerte com pH entre 2 e 11, **Tabela 2.3**, permitiram avaliar a influência do pH no processo de oxidação.

No intervalo entre $2,0 < \text{pH} < 9,0$, o potencial dos picos de oxidação 1a e 2a deslocou-se progressivamente para valores menos positivos com o aumento do pH, **Figura 3.11**. O declive das retas pontilhadas do gráfico E_{pa} vs. pH, é, para os dois picos 1a e 2a, de 59 mV por unidade de pH, **Figura 3.11B**, ou seja, ambos os mecanismos de oxidação envolvem a transferência do mesmo número de eletrões e protões. O número de eletrões transferidos n , foi determinado pela largura a meia altura dos picos, de $W_{1/2} \approx 100$ mV para o pico 1a, e $W_{1/2} \approx 78$ mV para o pico 2a, próximo do valor teórico de 90 mV, o que corresponde à transferência de um eletrão e de um protão. Verificou-se que o pH influenciou a intensidade de corrente de ambos os picos de oxidação, principalmente do pico 2a, **Figura 3.11**, que apresentou uma corrente mais elevada no intervalo $2,0 < \text{pH} < 6,0$, atingindo o valor máximo para $\text{pH} = 3,5$, em tampão acetato 0,1 M .

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

No desenvolvimento de novos fármacos, o conhecimento do valor do $\text{p}K_a$ é fundamental para determinar a sua atividade farmacológica, uma vez que o $\text{p}K_a$ influencia a absorção e a passagem dos compostos através das membranas celulares, devido aos seus efeitos sobre a lipossolubilidade e na solubilidade das moléculas. A maioria dos compostos farmacêuticos consiste em ácidos e bases fracas, presentes nas soluções sob a forma ionizada e não ionizada.

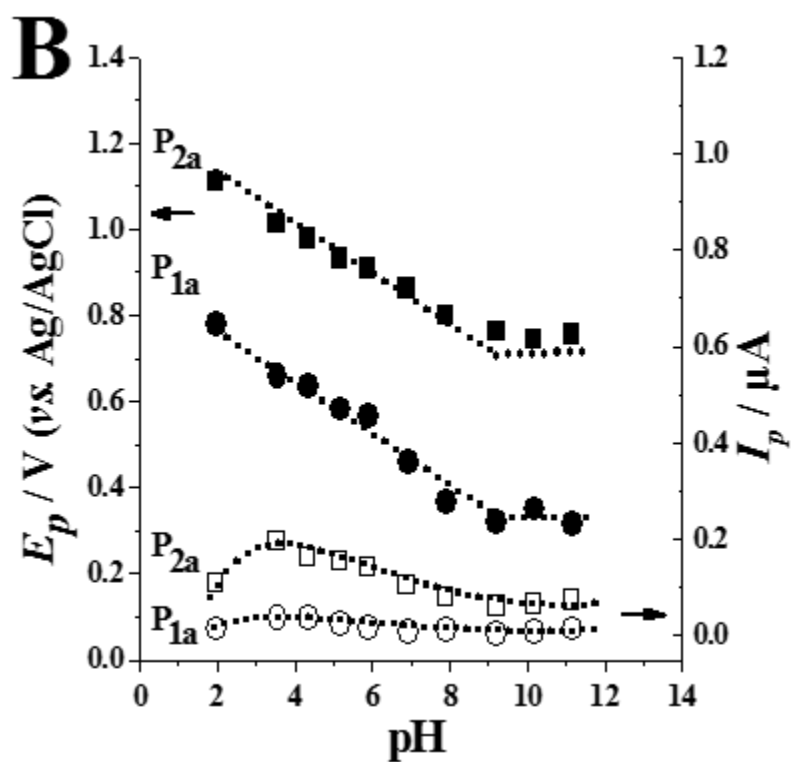
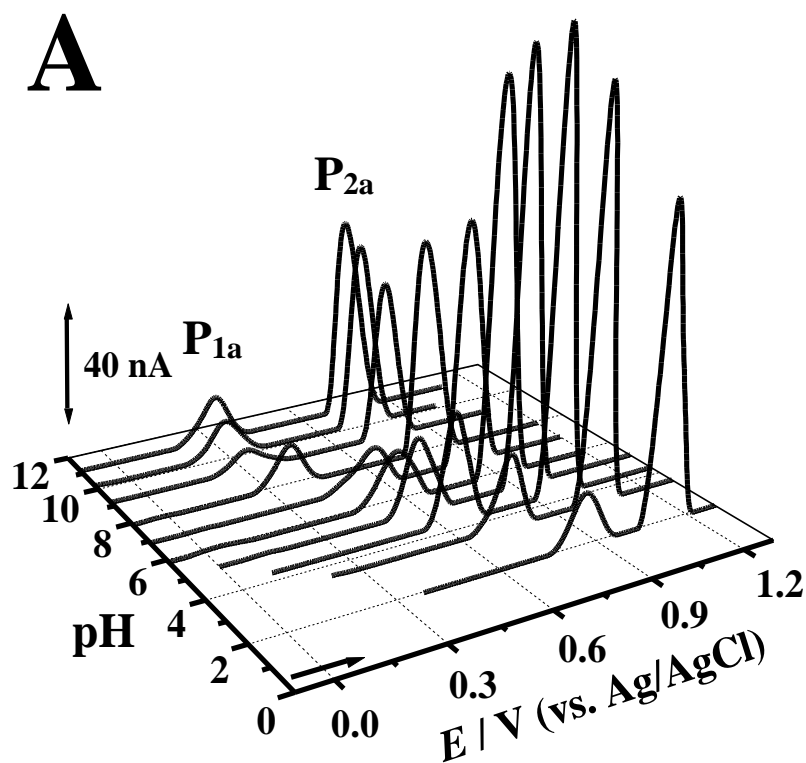


Figura 3.11 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção de linha de base, em soluções de $10 \mu\text{M}$ de HIDISA, em eletrólitos com diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação de (\bullet) E_{p1a} e da (\circ) I_{p1a} do pico 1a e (\blacksquare) E_{p2a} e da (\square) I_{p2a} do pico 2a vs. pH. O declive da reta é de 59 mV por unidade de pH. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As moléculas não ionizadas geralmente são lipossolúveis e podem atravessar a membrana celular mas, as moléculas ionizadas não o conseguem fazer devido à sua baixa lipossolubilidade. Portanto, a distribuição transmembranar de um fármaco é determinada principalmente pelo seu pK_a e pelo gradiente de pH através da membrana [273].

Para proceder à medição dos valores de pK_a , é necessário analisar o efeito do analito em eletrólitos de diferentes pHs e acompanhar a variação do potencial em função do estado de ionização da molécula, para diferentes pHs.

A partir dos dados analisados relativamente à influência do pH na oxidação da isatina-3-hidrazona, **Figura 3.11B**, o valor do pK_a determinado foi de $pK_a \sim 9$.

3.1.2.3 Isatina-3-semicarbazona (SEMISA)

Nos voltamogramas de DP efetuados numa solução de 20 μM de SEMISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), observou-se que a oxidação da SEMISA também ocorre em dois passos, com a formação dos picos 1a e 2a, **Figura 3.12**.

No segundo varrimento, sem limpar a superfície do GCE, observou-se a formação dos novos picos de oxidação, o pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,31 \text{ V}$ e o o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,48 \text{ V}$, ligeiramente desviado para valores mais positivos, quando comparado com a HIDISA. Estes resultados estão de acordo com os resultados de voltametria cíclica, **Figura 3.5A**.

Em relação à corrente dos picos, verificou-se que a corrente do pico 1a diminuiu significativamente com o número de varrimentos sucessivos, enquanto que a corrente do pico 4a aumenta, **Figura 3.12**, devido à oxidação dos produtos de oxidação que se estão a formar nos varrimentos seguintes.

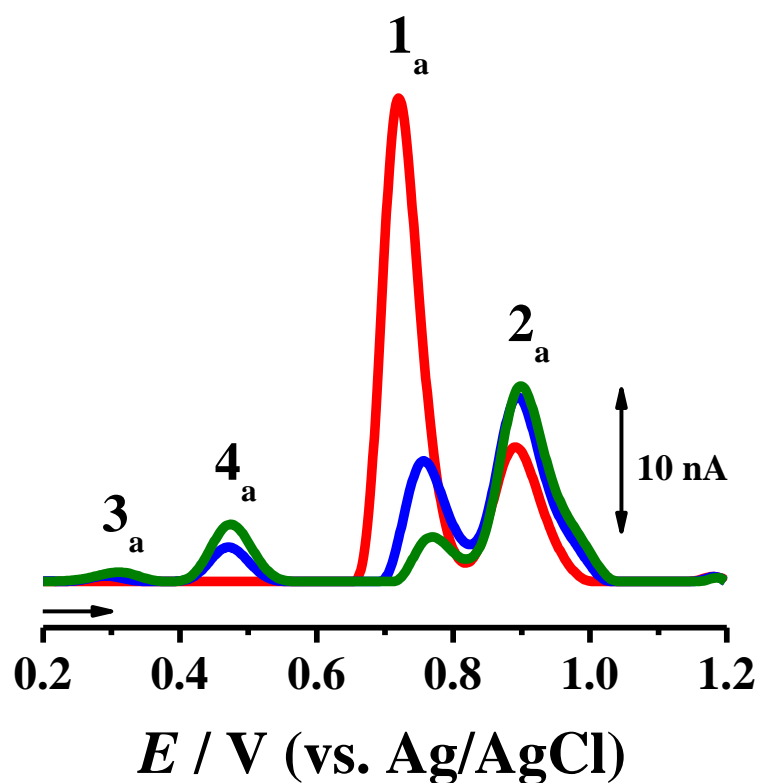


Figura 3.12 Voltamogramas sucessivos de DP numa solução de 10 μM de SEMISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A influência do pH foi avaliada por voltametria de DP, numa gama variada de eletrólitos inertes no intervalo de pH da **Tabela 2.3**.

No intervalo $3,0 < \text{pH} < 12,0$ verificou-se que, com o aumento do pH, ocorre um deslocamento do potencial de ambos os picos de oxidação 1a e 2a, para potenciais mais negativos, **Figura 3.13**.

O declive da reta pontilhada do gráfico E_{pa} vs. pH, **Figura 3.13B**, é, para ambos os picos, de 59 mV por unidade de pH, o que significa que os mecanismos de ambos os processos de oxidação envolvem o mesmo número de eletrões e protões. Em cada reação de oxidação ocorre a transferência de um eletrão e um protão, uma vez que $W_{1/2} \approx 60 \text{ mV}$ para o pico 1a e $W_{1/2} \approx 75 \text{ mV}$ para o pico 2a.

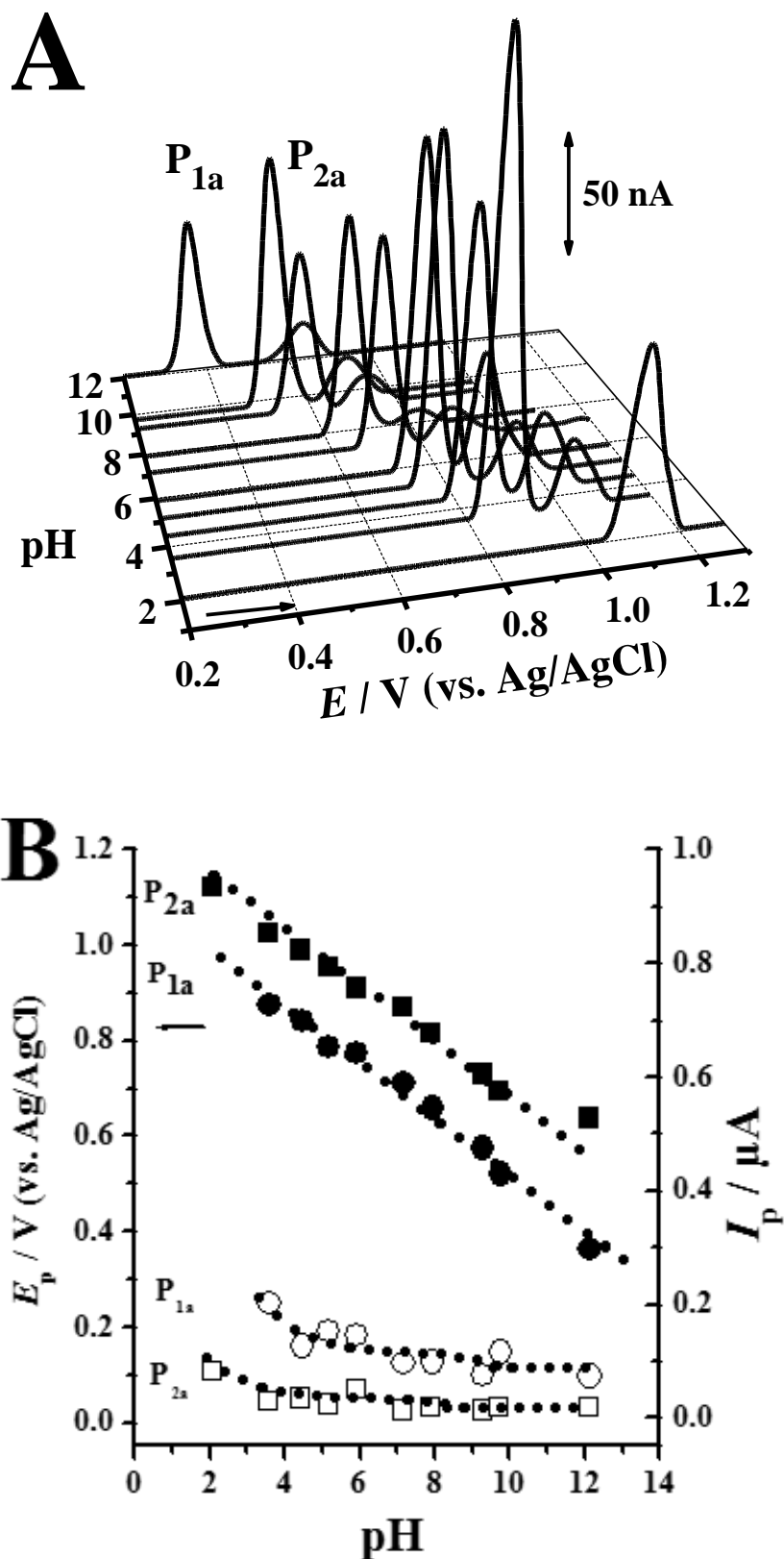


Figura 3.13 (A) Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em soluções de $20 \mu\text{M}$ de SEMISA, em eletrólitos com diferentes valores de pH. (B) Gráfico da variação de (●) E_{p1a} e (○) I_{p1a} do pico 1a e de (■) E_{p2a} e (□) I_{p2a} do pico 2a vs. pH. O declive das retas é de 59 mV por unidade de pH. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$

Também se verificou no gráfico E_{pa} vs. pH, **Figura 3.13B**, que a intensidade de corrente de ambos os picos de oxidação é maior no intervalo $2,0 < \text{pH} < 6,0$, atingindo o valor mais alto no eletrólito mais ácido, o que acontece devido ao efeito do pH na ionização do grupo semicarbazona que tem como consequência um aumento da hidrofobicidade e da adsorção na superfície hidrofóbica do GCE.

3.1.3 Voltametria de onda quadrada

Uma das grandes vantagens da voltametria de SW é a possibilidade de se observar durante um varrimento se a reação de transferência eletrônica é ou não reversível. A informação relativa à corrente direta e inversa do varrimento permite observar os picos de oxidação e de redução das espécies eletroativas na superfície do GCE, durante o mesmo varrimento de potencial.

O comportamento eletroquímico da ISA e da SEMISA foi avaliado por voltametria de SW, em soluções preparadas em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e com uma velocidade efetiva de 50 mV s^{-1} .

3.1.3.1 Isatina

Nos voltamogramas de SW efetuados numa solução de $50 \mu\text{M}$ de ISA, observou-se no primeiro varrimento os dois picos de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,98 \text{ V}$, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,12 \text{ V}$, mas no segundo varrimento não se observou nenhum pico de oxidação correspondente ao produto da oxidação da ISA, **Figura 3.14A**.

Para detetar o produto de oxidação da ISA na superfície do GCE, usou-se um GCE com a superfície limpa, imerso numa solução de $50 \mu\text{M}$ de ISA ao qual foi aplicado um potencial de $+ 1,10 \text{ V}$ durante 60 s. Este procedimento de condicionamento do eletrodo teve como objetivo forçar a oxidação das moléculas da ISA e a adsorção dos seus produtos de oxidação na superfície do GCE.

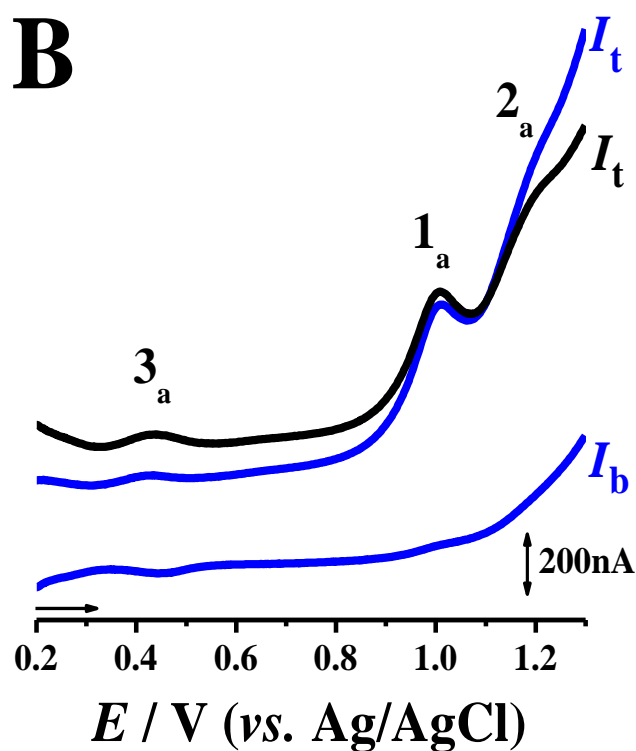
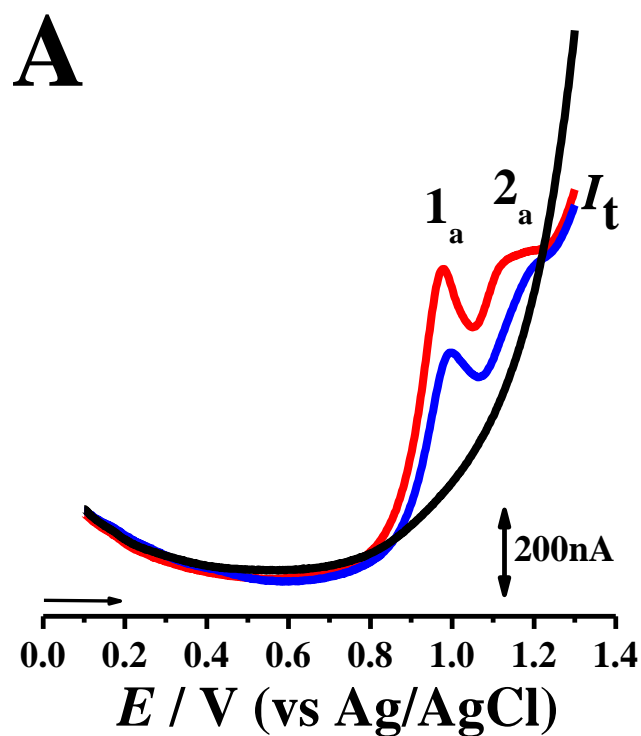


Figura 3.14 Voltamogramas de SW numa solução de 50 μM ISA em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M): **(A)** sem condicionamento do GCE, (—) eletrólito inerte, (—) primeiro e (—) segundo varrimento; **(B)** depois do condicionamento do GCE a + 1,10 V durante 60 s, seguido de + 0,30 V durante 60 s. (—) I_t – corrente total, (—) I_f – corrente direta, (—) I_b – corrente inversa. $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Contudo, a aplicação de um potencial tão elevado de + 1,10 V, levou à oxidação da ISA, seguida imediatamente da oxidação dos produtos de oxidação da ISA, e o que se observou por voltametria de SW foi a ocorrência de um pico 3a muito pequeno. Os resultados melhoraram quando, imediatamente a seguir ao primeiro condicionamento de + 1,10 V, se aplicou outro potencial de + 0,30 V durante 60 s. Durante este período os produtos de oxidação da ISA oxidados no primeiro condicionamento são reduzidos e, nos voltamogramas de SW observou-se o pico 3a bem definido, a $E_{p3a} = + 0,44$ V, **Figura 3.14B**.

A reversibilidade do pico pico 3a da ISA foi confirmada com a representação das componentes direta e inversa da corrente total, **Figura 3.14B**. As correntes de oxidação e redução do pico 3a são iguais, pois o produto de oxidação da ISA está só adsorvido numa monocamada na superfície do GCE.

3.1.3.2 Isatina-3-semicarbazona (SEMISA)

No primeiro voltamograma de SW realizado numa solução de 20 μ M de SEMISA, observou-se um comportamento semelhante aos resultados da voltametria cíclica e da voltametria de DP, dois picos de oxidação, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,75$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,89$ V, **Figura 3.15**.

A irreversibilidade dos picos 1a e 2a ficou demonstrada quando se observou a representação gráfica das componentes directa e inversa da corrente total, **Figura 3.15A(—)**.

No segundo voltamograma de SW observou-se o aparecimento dos novos picos de oxidação, reversíveis, o pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,36$ V, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,54$ V, que correspondem aos produtos de oxidação reversíveis da SEMISA, **Figura 3.15**, que também foram observados nos resultados obtidos pela voltametria cíclica, **Figura 3.7A**.

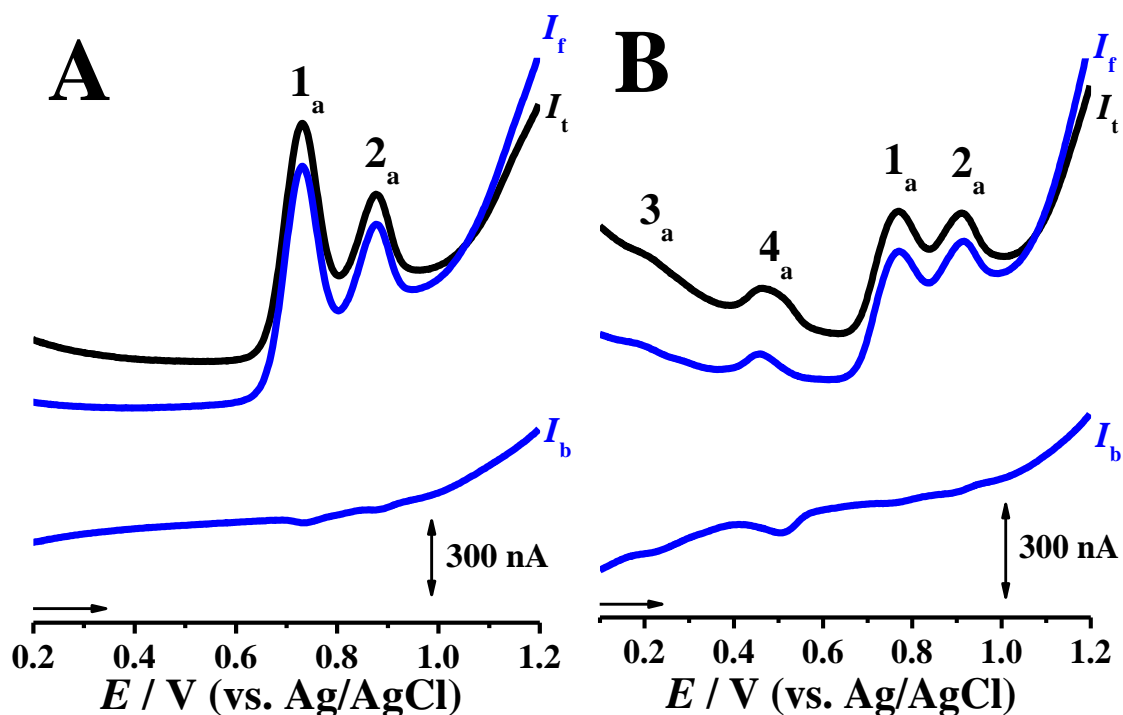


Figura 3.15 Voltamogramas de SW numa solução de 20 μM de SEMISA em electrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M): (A) primeiro e (B) terceiro varrimentos. I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa. $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Para todos os picos verificou-se um ligeiro desvio para valores menos positivos, em comparação com os resultados da voltametria cíclica, **Tabela 3.1**.

3.1.4 Mecanismos de Oxidação

A ISA e os seus derivados nitrogenados com os grupos funcionais nitro, hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona, apresentam comportamentos de oxidação eletroquímica diferentes entre si. Os mecanismos de oxidação da ISA e os seus derivados nitrogenados foram propostos para pH fisiológico pH = 7,0, **Figura 3.16 e 3.17**, com base nos resultados obtidos por voltametria cíclica, DP e SW, tendo em consideração (i) o anel pirrol que já está oxidado nas posições C2 e C3, (ii) o carácter aceitador e dador de eletrões do anel benzénico, e (iii) os diferentes grupos funcionais ligados à molécula da ISA [9,25,28,105,274–276].

3.1.4.1 Isatina

O mecanismo de oxidação proposto para a ISA está apresentado na **Figura 3.16**.

A oxidação da ISA prossegue em dois passos sucessivos que provocam alterações no anel benzênico. No primeiro passo, o pico 1a, ocorre a remoção de um elétron do anel benzênico, seguido de desprotonação e ataque nucleofílico direto por parte da água, com a produção da 7-hidroxiisatina, o tautômero mais estável, com menor energia. No segundo passo, o pico 2a corresponde à oxidação do grupo 7-OH da 7-hidroxiisatina produzida no primeiro passo da oxidação. O mecanismo no anel benzênico segue os mesmos passos da oxidação do fenol [105].

A oxidação do fenol ocorre num único passo, com a transferência de um elétron e um próton, e envolve a formação do radical fenóxido instável com três formas isoméricas, que pode ser oxidado por dois caminhos. As posições *orto* e *para* deste radical são favoráveis à ocorrência de reações químicas. Por um lado, o radical fenóxido é estabilizado com a introdução de grupos hidroxilo nas posições *orto* ou *para* do anel dando origem a *orto*- ou *para*-quinonas, que são imediatamente oxidados devido ao elevado potencial aplicado na oxidação do fenol. Os dois produtos de oxidação são depois reduzidos reversivelmente. Por outro lado, o radical fenóxido inicia a polimerização, levando à formação de produtos poliméricos não eletroativos que são depois adsorvidos, provocando o bloqueamento da superfície do GCE [105,276].

Tendo em conta os dados apresentados, a oxidação eletroquímica da ISA no GCE leva à formação de produtos de oxidação do tipo hidroquinona e catecol. A cinética e o mecanismo de reação relativamente às vias de oxidação e/ou polimerização do radical dependem do pH do meio e da concentração da ISA na solução.

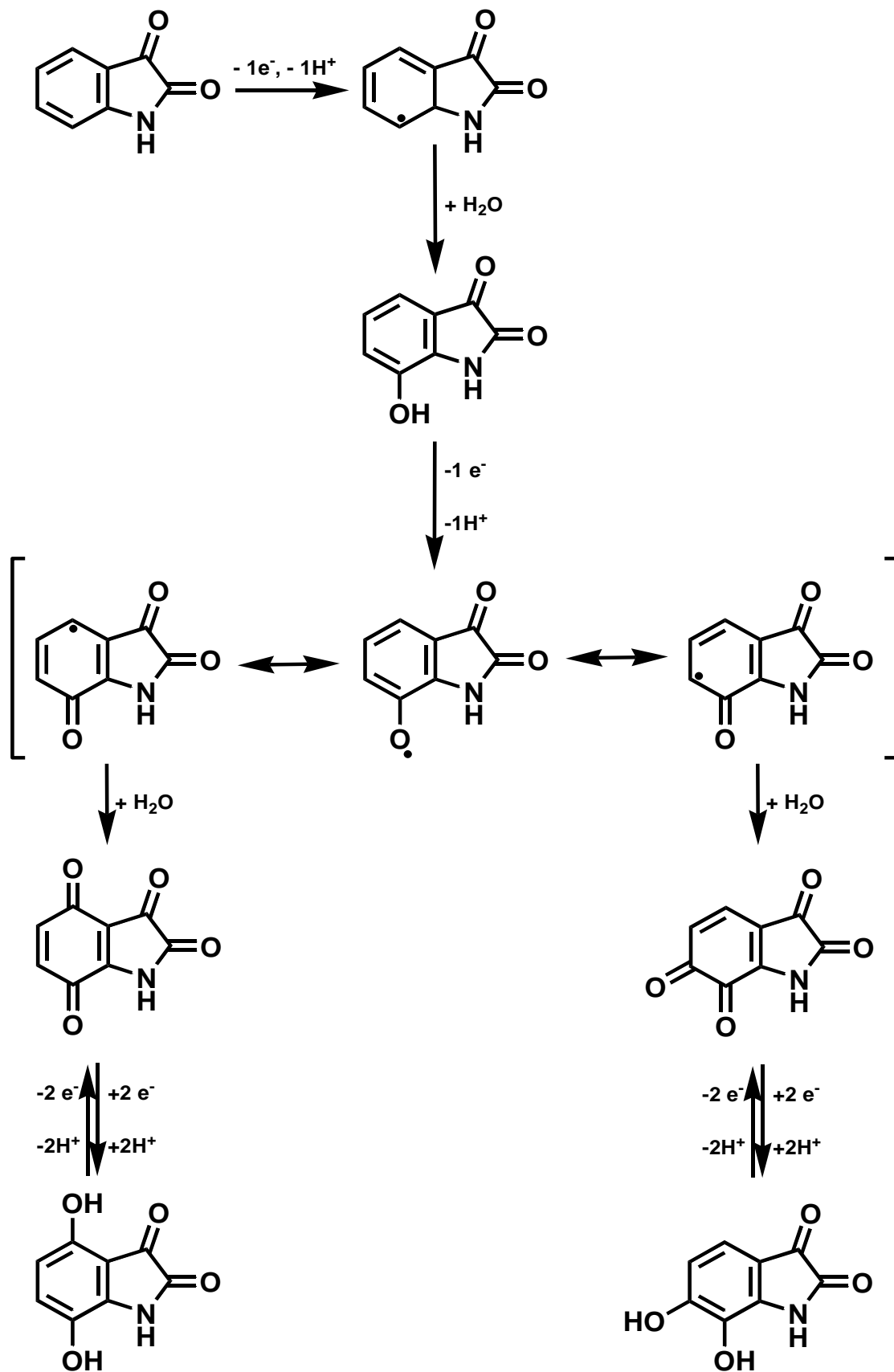


Figura 3.16 Mecanismo de oxidação proposto para a ISA.

3.1.4.2 5-Nitro-isatina

A oxidação da 5-NO₂-ISA segue o mesmo mecanismo de oxidação proposto para a ISA, **Figura 3.16**.

O comportamento anódico do derivado 5-NO₂-ISA **Figura 3.4**, é diferente de todos os outros derivados mas semelhante à oxidação da ISA, uma vez que tanto neste derivado como na ISA, a oxidação ocorre para potenciais mais elevados e com correntes de pico muito reduzidas e muito semelhantes às da ISA, **Tabela 3.1**.

Na 5-NO₂-ISA a corrente dos picos de oxidação é muito reduzida devido ao efeito de remoção de elétrons causado pelo grupo nitro que torna a molécula de ISA positivamente carregada o que faz com que o seu caráter de dador de elétrons seja menor, por isso é mais difícil oxidar a 5-NO₂-ISA, o que só acontece a potenciais mais elevados.

3.1.4.3 Isatina-3-hidrazona e Isatina-3-semicarbazona

Os mecanismos de oxidação propostos para a HIDISA e para a SEMISA estão apresentados na **Figura 3.17**.

O mecanismo de oxidação da HIDISA envolve a transferência de um elétron e de um próton nos dois passos e está associado à oxidação do grupo hidrazona ligado na posição C3, libertando N₂ e dando origem à molécula de ISA, **Figura 3.17A** [274]. Ao atingir potenciais mais elevados, a ISA produzida pela oxidação da HIDISA é também oxidada, seguindo o mecanismo proposto na **Figura 3.16**, com a formação dos produtos hidroquinona, quinona e polímeros de ISA, obtendo-se assim o processo catódico associado com o pico 3c.

O mecanismo de oxidação da SEMISA envolve a transferência de um elétron e um próton de modo que, no primeiro passo ocorre a formação de um radical livre.

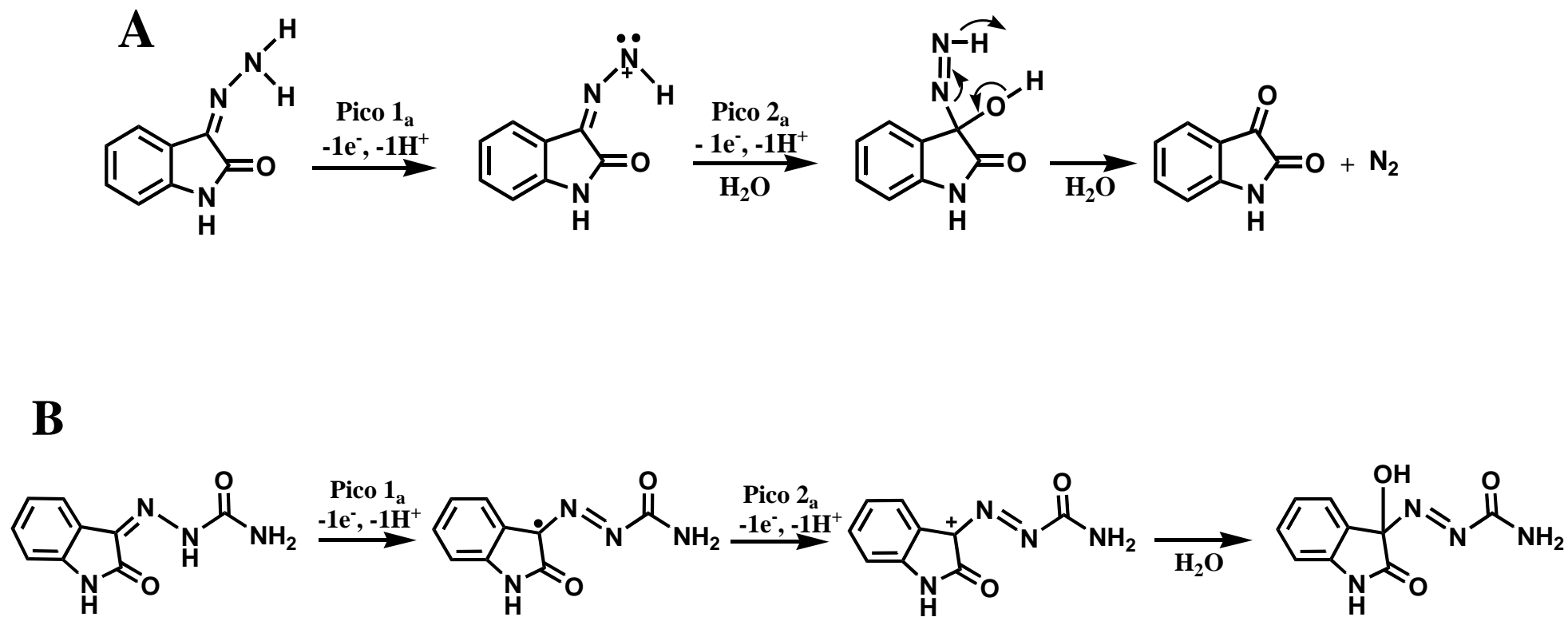


Figura 3.16 Esquema dos mecanismos de oxidação propostos para: (A) HIDISA e (B) SEMISA.

O segundo passo envolve a oxidação do radical livre e dá origem a um carbocátion, **Figura 3.17B**. Tal como na HIDISA, quando são aplicados potenciais mais elevados, o anel benzénico também é oxidado, formando um grupo hidroxilo na posição C7 e, a potencial elevado $E_p = 1,3$ V, ocorre a oxidação do fenol seguindo o mecanismo proposto para a oxidação da ISA, **Figura 3.16**, com a formação dos produtos quinonas, orto-quinona e para-quinona, e polímeros de ISA, observando-se assim no varrimento inverso os picos 3c e 4c.

Os grupos funcionais da hidrazona e da semicarbazona levam ao aparecimento de novos processos de oxidação e a um desvio para valores menos positivos do potencial dos picos anódicos da molécula da ISA, como observado pela voltametria cíclica, **Figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.7**. Comparando os picos de oxidação 1a e 2a da HIDISA e da SEMISA, **Figuras 3.5 e 3.7**, com os picos de oxidação 1a e 2a da ISA, **Figura 3.3**, verifica-se que os potenciais de oxidação dos derivados deslocaram-se para valores menos positivos e a intensidade de corrente aumenta consideravelmente. Os grupos hidrazona e semicarbazona ligados à molécula da ISA sofrem oxidação que ocorre a potenciais menos positivos, uma vez que são grupos doadores de eletrões mais facilmente oxidados, conseqüentemente têm um melhor poder redutor que o da ISA [9,27,274].

3.1.4.4 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona

A 5-Br-TIOSEMISA apresentou correntes de pico mais baixas nos voltamogramas cíclicos, **Figura 3.7B**, quando comparados com as correntes dos picos de oxidação da ISA, **Figura 3.3**. Esta diferença pode ser atribuída ao efeito estérico do bromo ligado à molécula que dificulta a aproximação do grupo semicarbazona à superfície do GCE.

3.2 Redução Eletroquímica

3.2.1 Voltametria cíclica

As experiências de voltametria cíclica realizaram-se no intervalo de potencial 0,0 V até -1,2 V, em soluções de 500 μM de ISA, **Figura 3.18A**, 260 μM de 5-NO₂-ISA, **Figura 3.18B**, 186 μM de HIDISA, **Figura 3.18C**, 260 μM de 7-CH₃-HIDISA, **Figura 3.18D**, 500 μM de SEMISA, **Figura 3.18E**, e 167 μM de 5-Br-TIOSEMISA, **Figura 3.18F**, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), em soluções saturadas de N₂.

O comportamento observado nos voltamogramas cíclicos foi idêntico para a ISA e para os seus derivados nitrogenados, com o aparecimento de um pico catódico irreversível, pico 6c, a $E_{p6c} = -0,80$ V, **Tabela 3.2**. Contudo, na ISA o pico catódico ocorreu a potenciais menos negativos, $E_{p6c} = -0,58$ V, **Figuras 3.18A e Tabela 3.2**.

Nos voltamogramas cíclicos realizados numa solução de 260 μM de 5-NO₂-ISA observaram-se dois picos de redução irreversíveis, o pico 5c a $E_{p5c} = -0,40$ V, e o pico 6c, a $E_{p6c} = -0,70$ V, **Figura 3.17B**. Depois de invertido o varrimento, observou-se um novo pico de oxidação, o pico 7a, a $E_{p7a} = -0,06$ V, que corresponde à oxidação do produto de redução da 5-NO₂-ISA, formado na superfície do GCE. Após varrimentos sucessivos por voltametria cíclica, sem limpar a superfície do GCE entre os varrimentos, surgiu um novo pico de redução, o pico 7c, a $E_{p7c} = -0,09$ V.

O pico 6c na ISA ocorreu devido à redução do grupo carbonil na posição C3 do anel pirrol [27]. O potencial do pico 6c dos derivados nitrogenados hidrazona, **Figura 3.17C e D**, e semicarbazona, **Figura 3.17E**, deslocou-se no sentido dos potenciais mais negativos, relativamente ao potencial da ISA, **Figuras 3.17A e Tabela 3.2**.

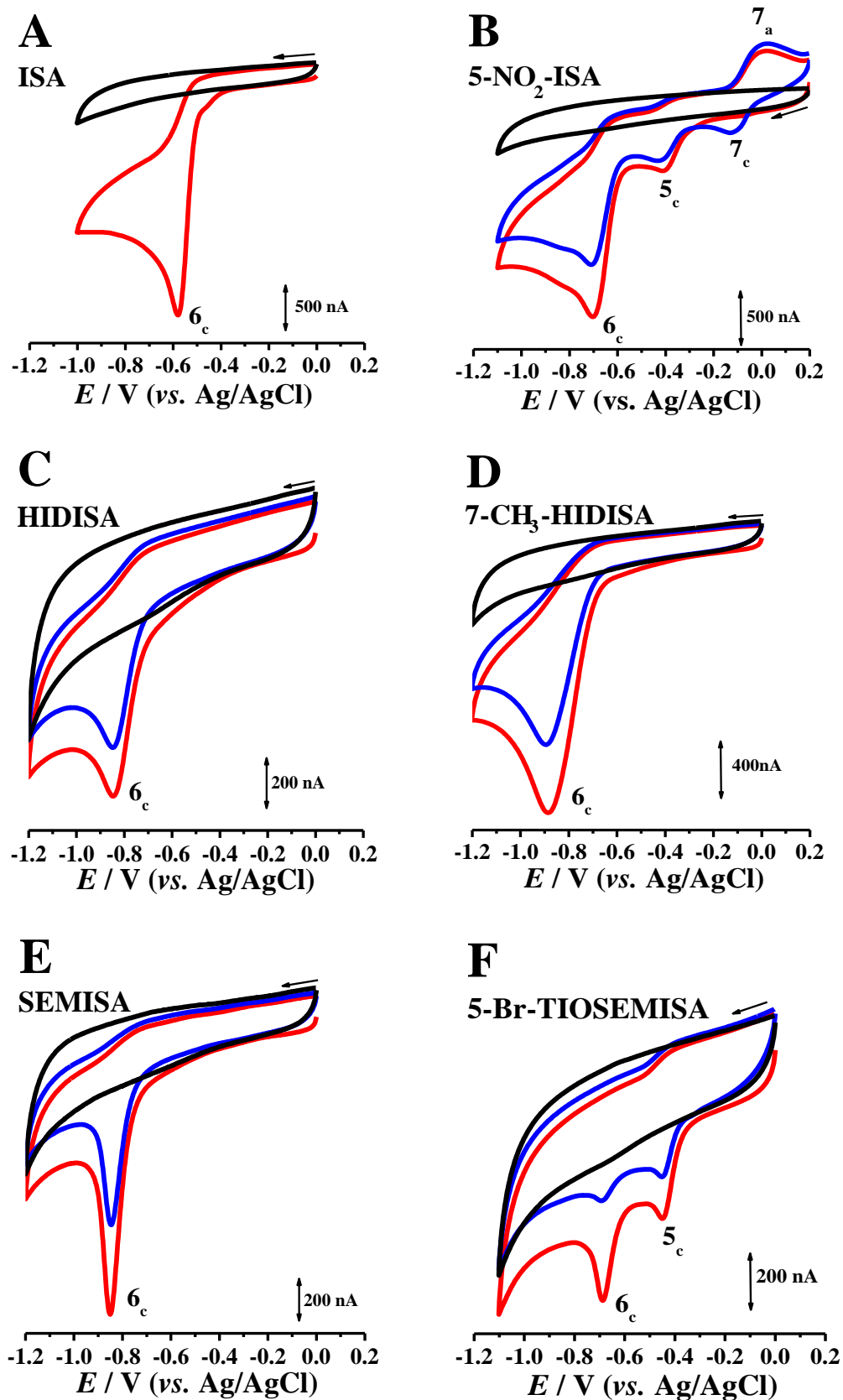


Figura 3.18 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e em solução de: (A) 500 μ M de ISA, (B) 260 μ M de 5-NO₂-ISA, (C) 186 μ M HIDISA, (D) 260 μ M de 7-CH₃-HIDISA, (E) 500 μ M de SEMISA e (F) 167 μ M de 5-Br-TIOSEMISA; (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 3.2 Potenciais de redução dos derivados nitrogenados da ISA obtidos por voltametria cíclica.

Derivados nitrogenados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)	
	1º Varrimento	2º Varrimento
ISA	$E_{p6c} = - 0,60 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,60 \text{ V}$
5-NO ₂ -ISA	$E_{p5c} = - 0,40 \text{ V}$ $E_{p6c} = - 0,50 \text{ V}$	$E_{p5c} = - 0,40 \text{ V}$ $E_{p6c} = - 0,70 \text{ V}$ $E_{p7a} = - 0,06 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,11 \text{ V}$
HIDISA	$E_{p6c} = - 0,85 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,84 \text{ V}$
7-CH ₃ -HIDISA	$E_{p6c} = - 0,87 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,89 \text{ V}$
SEMISA	$E_{p6c} = - 0,85 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,85 \text{ V}$
TIOSEMISA	$E_{p6c} = - 0,77 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,77 \text{ V}$
5-Br-TIOSEMISA	$E_{p5c} = - 0,45 \text{ V}$ $E_{p6c} = - 0,68 \text{ V}$	$E_{p5c} = - 0,44 \text{ V}$ $E_{p6c} = - 0,68 \text{ V}$

Os mecanismos de redução dos derivados HIDISA e SEMISA estão associados aos grupos funcionais da posição C3 da ISA, uma vez que tanto a hidrazona como a semicarbazona são grupos que possuem um forte caráter de doadores de elétrons [274,275].

O aparecimento do pico 7c no sentido negativo do varrimento veio confirmar a reversibilidade do pico 7a. Uma vez que as correntes dos picos anódico e catódico são equivalentes e considerando a diferença de $|E_{p7a} - E_{p7c}| = 30 \text{ mV}$, pode concluir-se que a reação reversível de redução do pico 7c ocorre com a transferência de dois elétrons,

Figura 3.17B.

Os resultados da voltametria cíclica obtidos numa solução de 167 μM de 5-Br-TIOSEMISA, **Figuras 3.17F**, revelaram dois picos de redução irreversíveis, pico 5c, a $E_{p5c} = -0,45 \text{ V}$, e pico 6c, a $E_{p6c} = -0,68 \text{ V}$. No segundo varrimento, a corrente dos picos 5c e 6c diminui devido à forte adsorção da 5-Br-TIOSEMISA e dos seus produtos de redução na superfície do GCE. O pico de redução 5c está associado com a cisão da ligação carbono-bromo na posição C5, **Figura 3.17F**.

3.2.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

Os voltamogramas de DP registados numa solução de 10 μM de HIDISA, revelaram um processo de redução que ocorre apenas num único passo, com a formação do pico de redução irreversível e dependente do pH, o pico 6c, **Figura 3.18**.

A influência do pH na redução eletroquímica da HIDISA e da 5-NO₂-ISA foi investigada por voltametria de DP, num intervalo de eletrólitos de força iónica 0,1 M, que variou entre $2,0 < \text{pH} < 12,0$, **Tabela 2.3**.

O aumento do pH provocou um desvio do potencial do pico para valores menos positivos, devido à rápida protonação do grupo hidrazona que, como todos os ácidos conjugados é mais facilmente reduzida do que a base. A corrente do pico 6c é mais elevada em meio ácido e atinge o valor máximo para $\text{pH} = 2,0$, **Figura 3.18A**.

No intervalo $2,0 < \text{pH} < 9,0$, a dependência do pH é linear e o declive da reta pontilhada é de 59 mV por unidade de pH, ou seja, na redução da HIDISA estão envolvidos o mesmo número de eletrões e protões **Figura 3.18B**. A largura a meia altura do pico 6c é $W_{1/2} \sim 78 \text{ mV}$, sendo assim, nesta redução ocorre a transferência de um eletrão e de um protão, o que está de acordo com os resultados de voltametria cíclica. Esta transferência eletrónica vem associada à clivagem da ligação nitrogénio-nitrogénio do grupo funcional hidrazona.

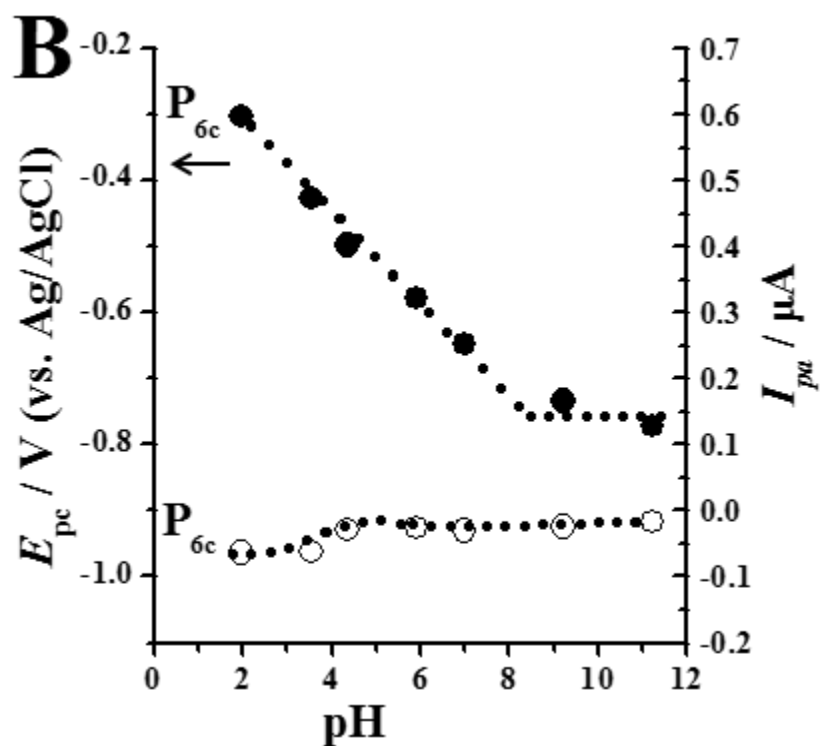
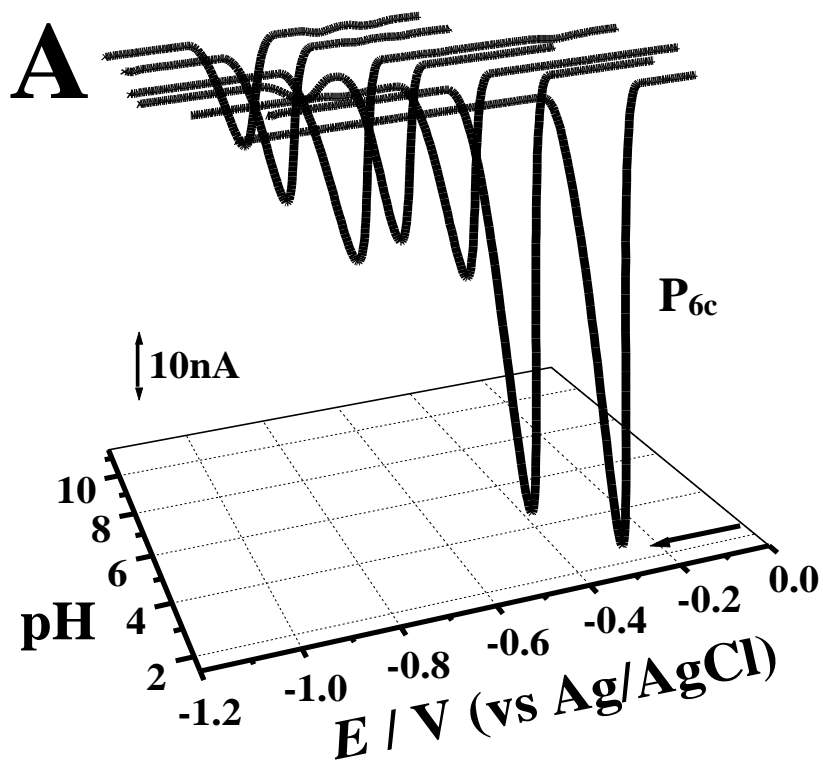


Figura 3.18 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção da linha de base, numa solução de 10 μM de HIDISA, em função do pH. (B) Gráfico da variação de $(\bullet) E_{p_{6c}}$ e $(\circ) I_{p_{6c}}$, do pico 6c vs. pH. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. O declive da reta pontilhada é de 59 mV por unidade de pH.

Para $\text{pH} > 9,0$, a redução da HIDISA é independente do pH, ou seja, a reação passa a envolver apenas a transferência de um elétron, tal como indicam os resultados de voltametria cíclica, **Figura 3.18B**.

Nos voltamogramas de DP realizados numa solução de $20 \mu\text{M}$ de 5- NO_2 -ISA observou-se que o processo de redução ocorre em dois passos, com a ocorrência dos picos 5c e 6c, **Figura 3.19**.

O pico 5c corresponde à redução do grupo nitro ligado à molécula da ISA. No intervalo $2,0 < \text{pH} \leq 10,0$, com o aumento do pH, os potenciais do pico de redução deslocam-se no sentido de valores menos positivos, **Figura 3.19**. A reta pontuada do gráfico E_{p5c} vs. pH tem um declive de 59 mV por unidade de pH ou seja, o mecanismo de redução da 5- NO_2 -ISA envolve o mesmo número de elétrons e prótons. A largura a meia altura do pico 5c é $W_{1/2} \sim 77 \text{ mV}$, por isso este processo de redução envolve a transferência de um elétron e de um próton.

Aumentando o pH no intervalo $2,0 < \text{pH} < 10,0$, o potencial do pico 6c da 5- NO_2 -ISA desloca-se no sentido dos valores menos positivos, **Figura 3.19A**. A reta pontilhada do gráfico E_{p6c} vs. pH também tem um declive de 59 mV por unidade de pH, ou seja, esta reação envolve igualmente o mesmo número de elétrons e prótons. Como a largura a meia altura do pico 6c é $W_{1/2} \sim 82 \text{ mV}$, a reação de redução envolve a transferência de um próton e de um elétron.

Para $\text{pH} \geq 10$, o pico de redução 6c da 5- NO_2 -ISA é independente do pH o que significa que o mecanismo de redução envolve apenas a transferência de um elétron, **Figura 3.19B**.

Tendo em conta os resultados obtidos através da análise da influencia do pH na redução eletroquímica da 5- NO_2 -ISA foi proposto o mecanismo de redução, **Figura 3.21**.

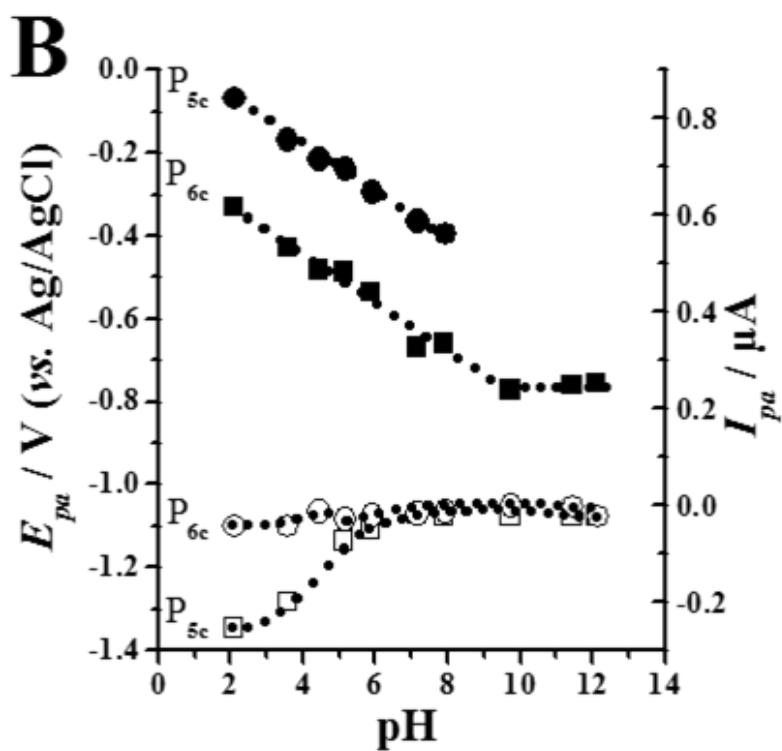
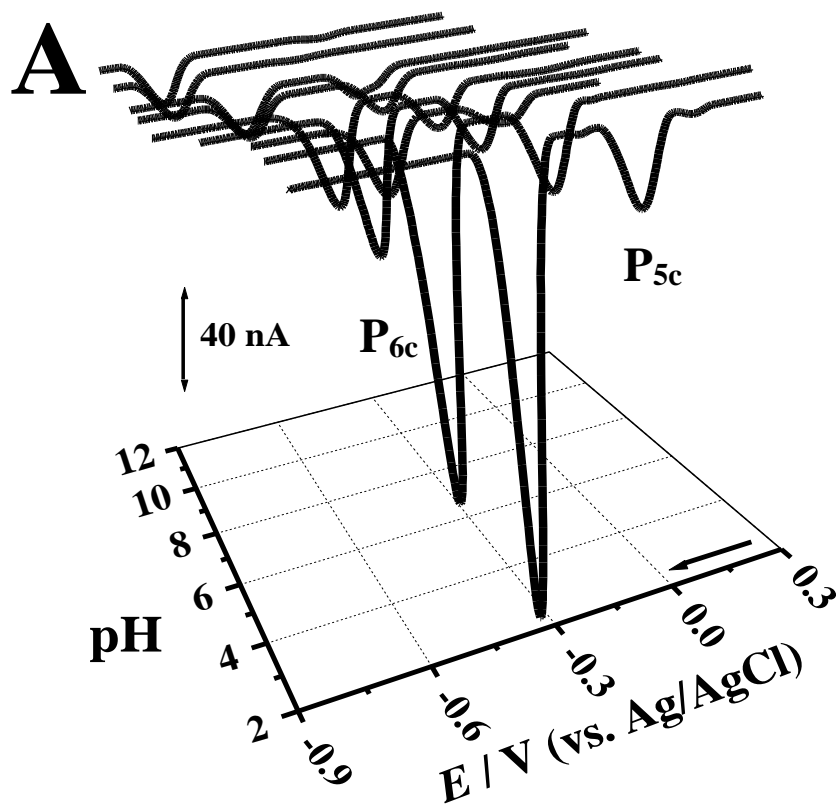


Figura 3.19 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção da linha de base, numa solução de $20 \mu\text{M}$ de 5- NO_2 -ISA, em função do pH. (B) Gráfico da variação de (\bullet) E_{p5c} e (\circ) I_{p5c} do pico 5c e de (\blacksquare) E_{p6c} e (\square) I_{p6c} do pico 6c, vs. pH. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. O declive das retas pontilhadas é de 59 mV por unidade de pH.

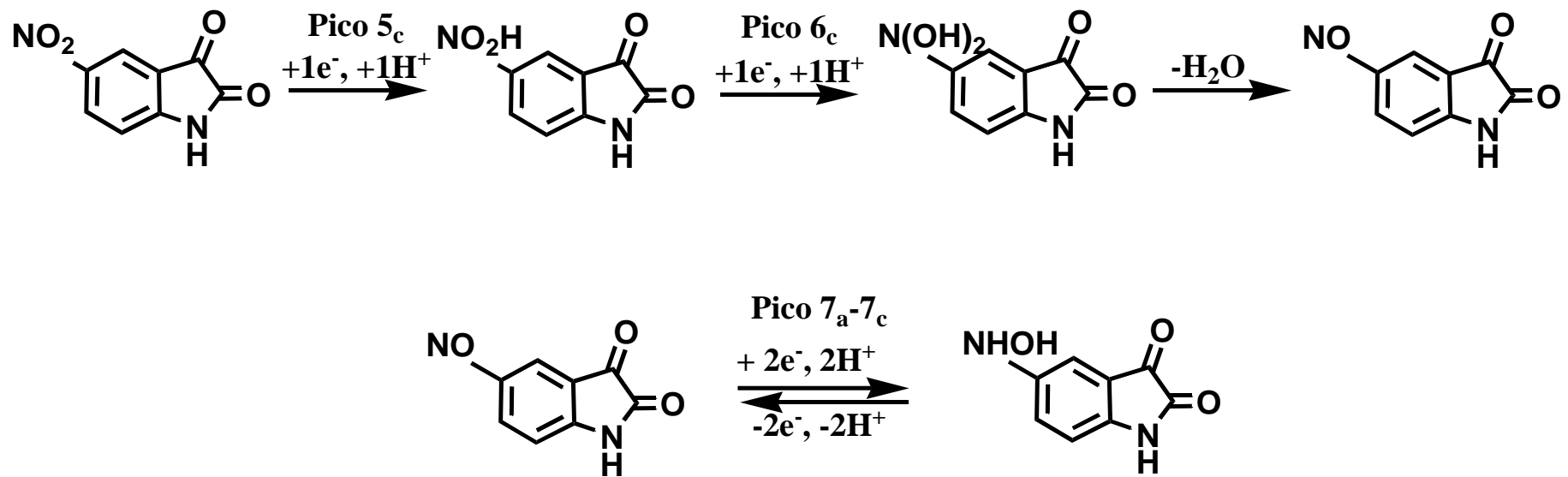


Figura 3.21 Esquema do mecanismo proposto para a redução da 5-NO₂-ISA.

Foram realizados voltamogramas de impulso diferencial numa solução de 5-NO₂-ISA, em diferentes intervalos de potencial, com o objetivo de saber qual dos picos de redução, 5c ou 6c, deu origem ao pico de redução 7c, **Figura 3.20**.

O primeiro voltamograma de DP foi efetuado no intervalo de potencial de 0,0 V até - 0,4 V, **Figura 3.20A**. No segundo varrimento, sem limpar a superfície do GCE entre cada varrimento, não se detetou nenhum produto de redução eletroativo. A mesma experiência foi repetida, mas desta vez no intervalo de potencial de 0,0 V até -1.2 V e no primeiro varrimento observaram-se os dois picos de redução, o pico 5c, a $E_{p5c} = - 0,40$ V, e o pico 6c, a $E_{p6c} = - 0,63$ V, **Figura 3.20B**. No segundo varrimento observou-se um novo pico de redução, o pico 7c, a $E_{p7c} = - 0,11$ V, que está associado aos produtos de redução formados no pico 6c, **Figura 3.20B**. Esta experiência confirma que a redução da 5-NO₂-ISA está associada ao grupo nitro, uma vez que os produtos de redução da ISA não são eletroativos.

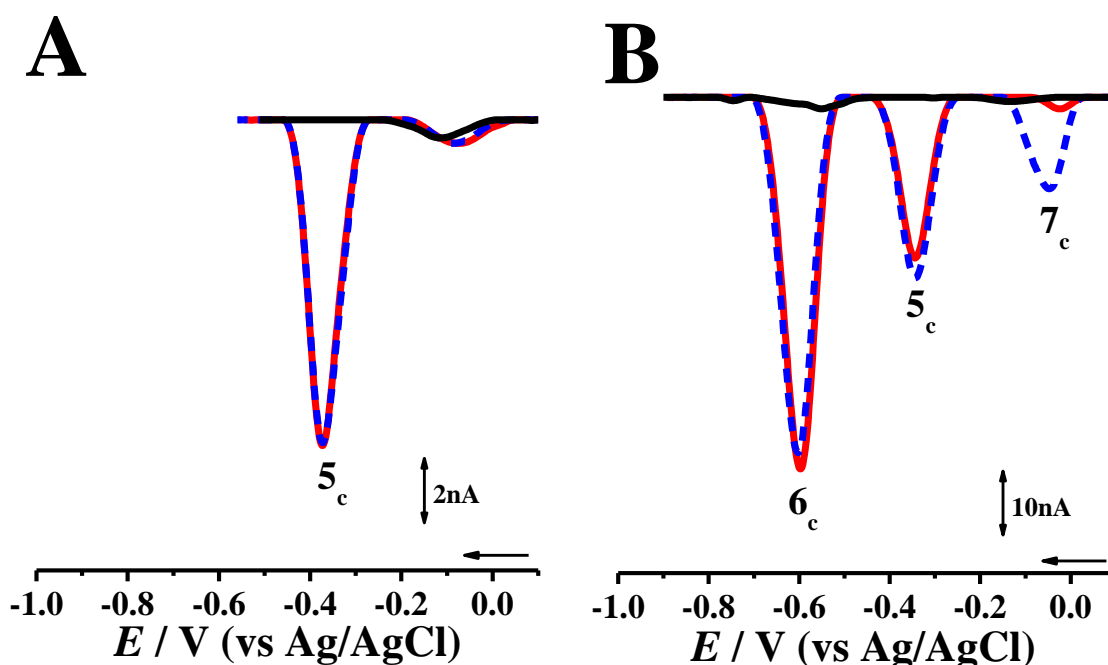


Figura 3.20 Voltamogramas sucessivos de SW, com correção da linha de base, numa solução de 20 μ M 5-NO₂-ISA, em eletrólito inerte pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M: (A) 0,1 V a - 0,5 V e (B) 0,1 V a -1,0 V, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $\nu = 5$ mV/s.

De acordo com os resultados de voltametria de DP, a redução da 5-NO₂-ISA ocorre duas etapas, a primeira em que ocorre a formação dos picos de redução 5c e 6c, e que dá origem à 5-NO₂-ISA e a segunda em que se dá a oxidação da 5-hidroxiainaisatina a 5-nitrosoisatina, um processo reversível e que envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, o par de picos 7a - 7c, **Figura 3.17B**. Pode concluir-se que quando se aplicam potenciais com valores muito negativos, favorece-se a redução da 5-NO₂-ISA a 5-hidroxiainaisatina.

3.3 Conclusões

O comportamento eletroquímico da ISA e dos seus seis derivados nitrogenados com os grupos funcionais nitro, hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona, que possuem um perfil farmacológico muito vasto, onde se incluem diversas aplicações clínicas, foi estudado utilizando o GCE e eletrólitos inertes de diferentes pHs. Os resultados obtidos revelaram que os grupos funcionais, nitro, hidrazona, semicarbazona, e tiosemicarbazona, ligados à estrutura anelar da ISA, apresentam diferentes mecanismos de oxidação e redução característicos de cada um dos grupos funcionais e propriedades redox distintas quando comparados com o comportamento eletroquímico da ISA.

O processo de oxidação da ISA e dos derivados nitrogenados com os grupos funcionais nitro, hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona ocorre em duas etapas irreversíveis, dependentes do pH e controlados por adsorção, com a formação de produtos de oxidação eletroativos. A oxidação dos derivados hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona da ISA, ocorre no grupo substituinte e dá origem a N₂ e à ISA que também sofre oxidação no anel benzénico. O mecanismo de oxidação da 5-NO₂-ISA é idêntico ao da ISA. A constante de ionização determinada para a HIDISA é de pK_a ~ 9.

Os mecanismos de redução dos derivados nitrogenados da ISA são idênticos à redução da ISA. O processo ocorre num único passo irreversível que envolve a formação de um pico catódico dependente do pH. Os grupos hidrazona e semicarbazona favorecem o caráter dador de elétrons enquanto o grupo nitro favorece o caráter de aceitador de elétrons da ISA. O mecanismo de redução da 5-NO₂-ISA é um processo que envolve dois passos com a formação de dois picos catódicos irreversíveis e um produto de redução eletroativo reversível. A constante de ionização determinada para a 5-NO₂-ISA é de pK_a ~ 10.

CAPÍTULO 4

Estudo Voltamétrico de Derivados Halogenados da Isatina

Neste capítulo são apresentados os processos de oxidação e redução de onze derivados halogenados da ISA, que foram investigados por voltametria cíclica, de DP e de SW, utilizando o GCE, e foram propostos os seus mecanismos redox [91]. Os derivados halogenados da ISA possuem na sua estrutura um ou mais átomos de halogéneo Cl, F, Br e I, nas posições C4, C5, C6 e C7, **Figura 4.1**. Estas são consideradas moléculas bioativas muito promissoras, e utilizadas na síntese de princípios ativos e de substâncias com interesse farmacêutico.

O estudo inicial das moléculas realizou-se por voltametria cíclica, com velocidade de varrimento $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, em soluções de concentração de $\sim 200 \mu\text{M}$, preparadas diretamente em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$). Durante as medidas voltamétricas foi mantido um fluxo constante de N_2 de forma a evitar a difusão do oxigénio atmosférico para o interior das soluções.

Todos os derivados halogenados apresentaram comportamento eletroquímico na superfície do GCE, tendo-se verificado a existência de vários picos de oxidação e redução, **Figuras 4.2 e 4.3**. Os valores dos potenciais de oxidação e redução obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos estão apresentados nas **Tabelas 4.1 e 4.2**.

Uma vez que ambos os processos de oxidação e redução apresentaram comportamentos independentes entre si, foi realizado o estudo separadamente.

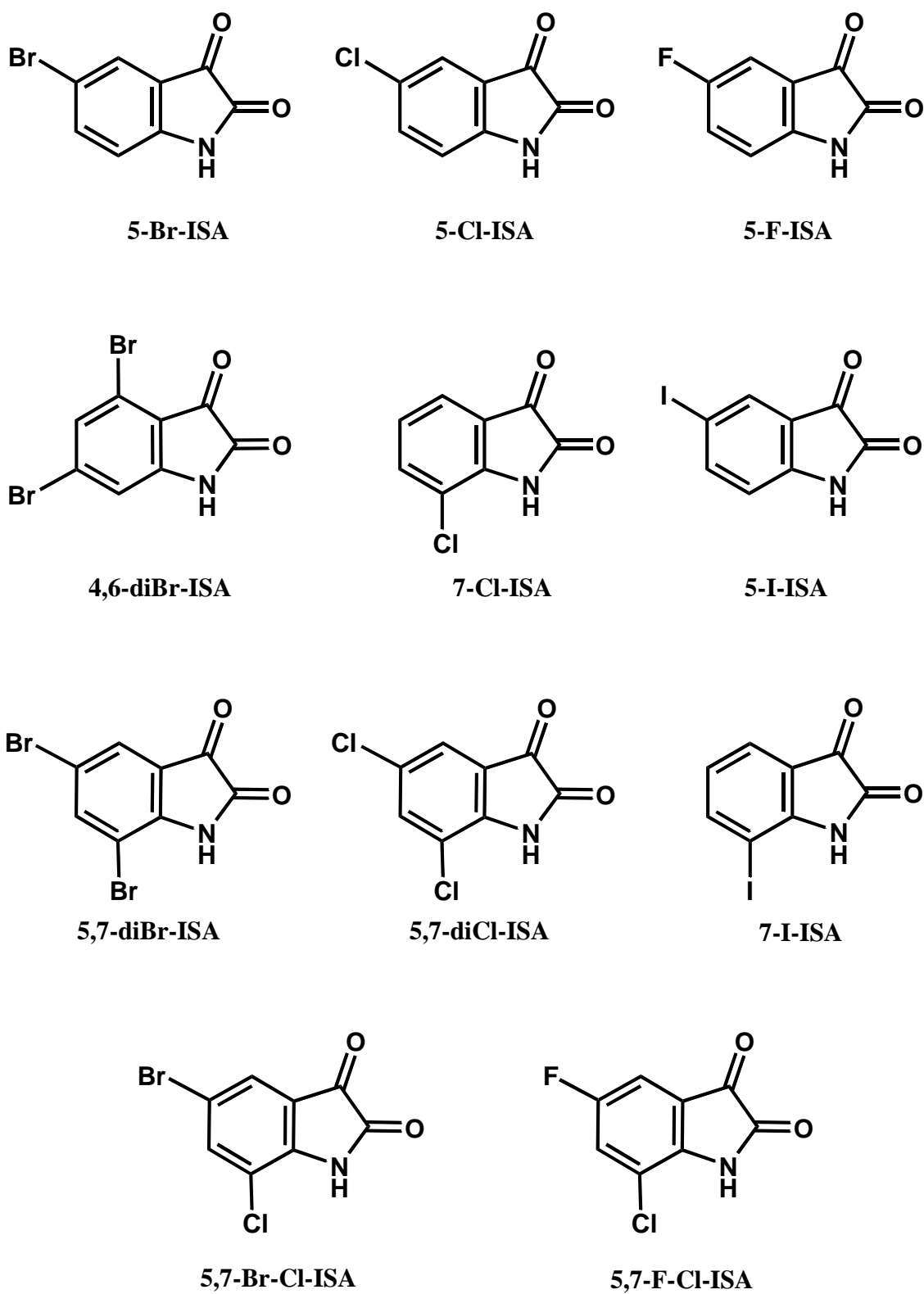


Figura 4.1 Estruturas químicas de derivados halogenados da ISA, com os átomos de Br, Cl, F e I.

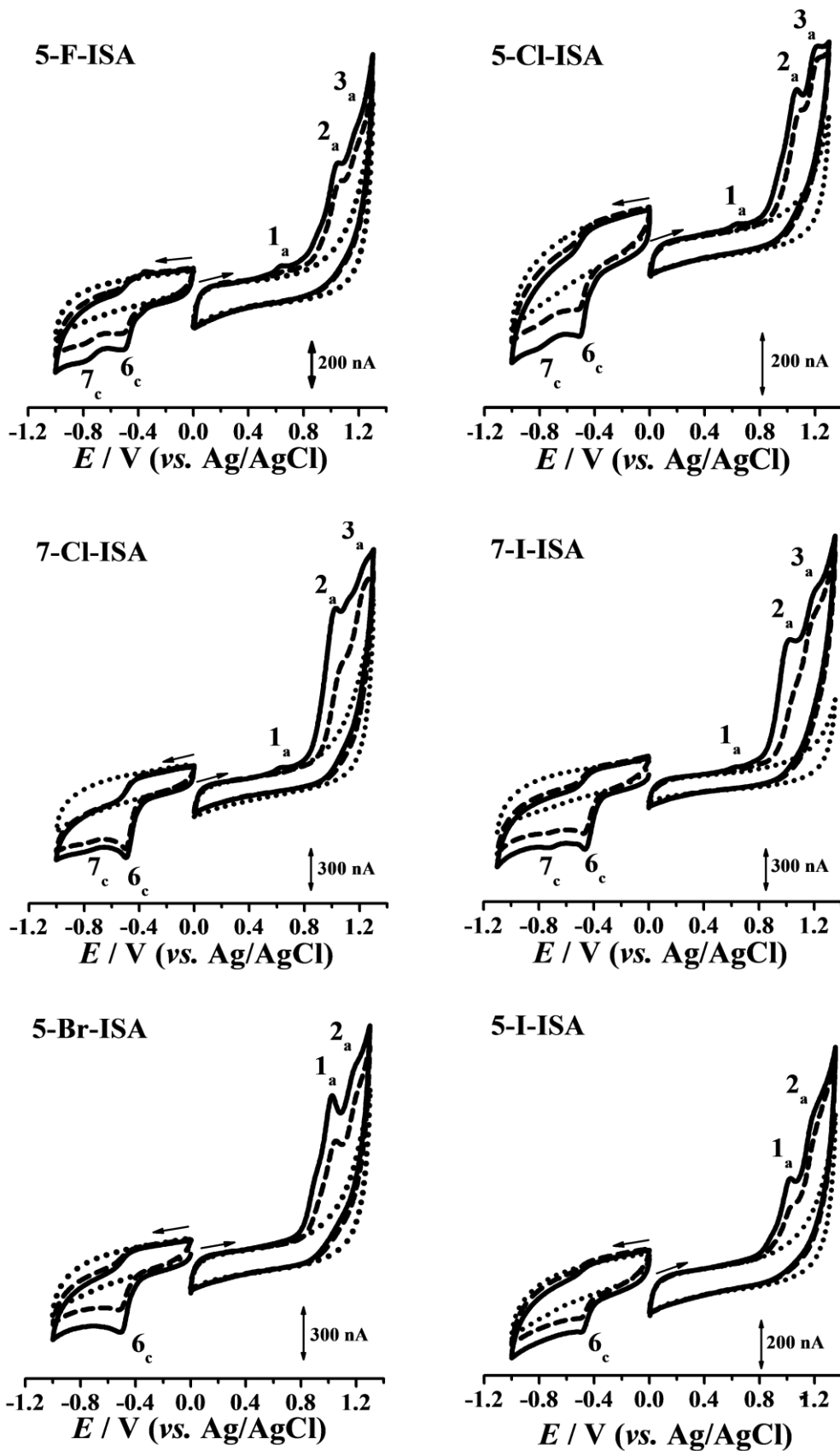


Figura 4.2 Voltamogramas cíclicos em (•••) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em soluções de ~ 200 μ M de derivados mono-halogenados, (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

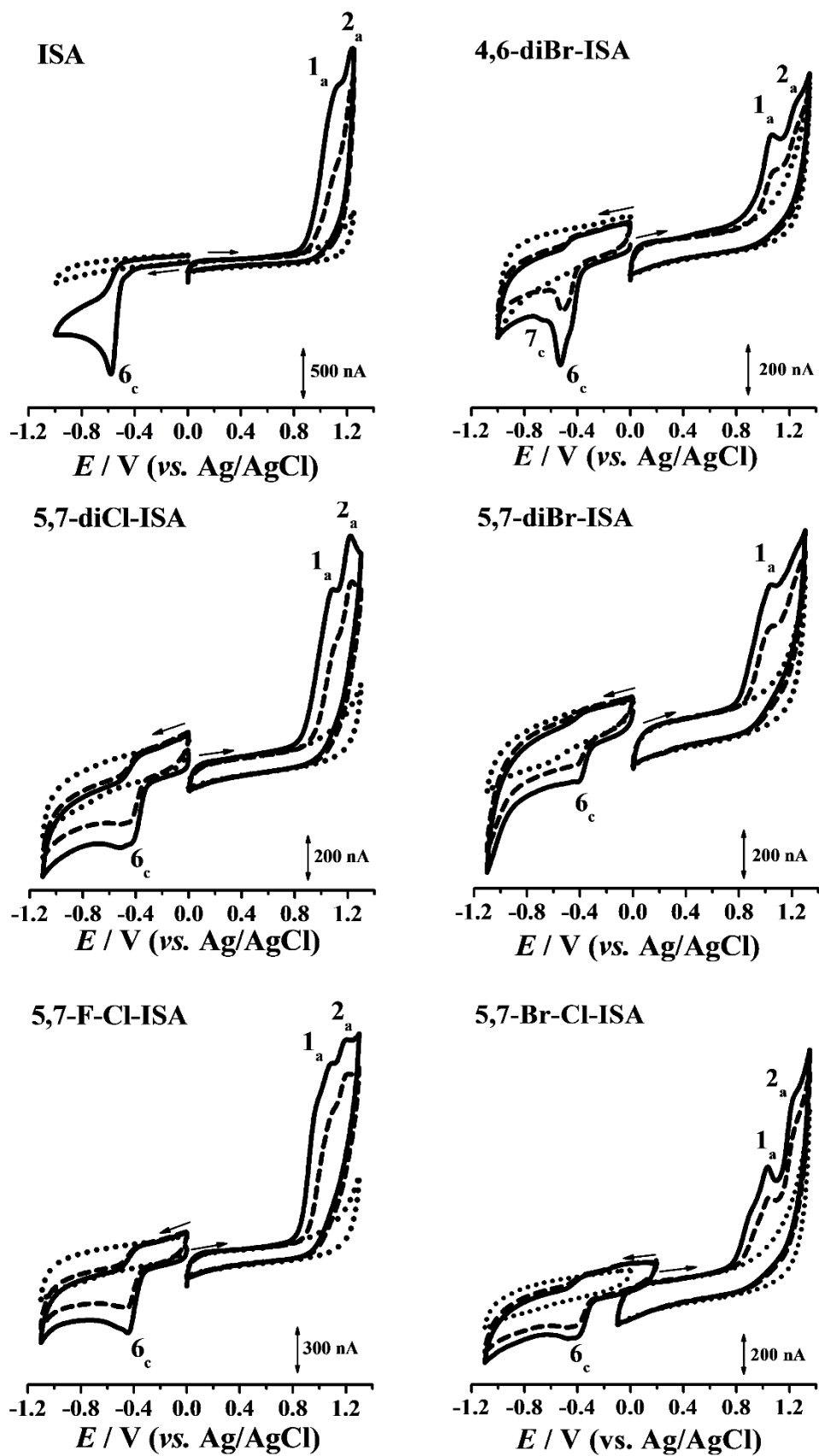


Figura 4.3 Voltamogramas cíclicos em (•••) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em 500 μ M ISA e em soluções de $\sim 200 \mu$ M de derivados di-halogenados: (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 4.1 Potenciais de oxidação dos derivados halogenados da ISA, obtidos por voltametria cíclica, a pH = 7,0.

Derivados Halogenados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)	
	1º Varrimento	2º Varrimento
ISA	$E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 1,16 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,20 \text{ V}$
5-F-ISA	$E_{p1a} = + 0,64 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,17 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 0,66 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,00 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,16 \text{ V}$
5-Cl-ISA	$E_{p1a} = + 0,63 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,06 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,07 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,21 \text{ V}$
5-Br-ISA	$E_{p2a} = + 1,02 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,18 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$
5-I-ISA	$E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,18 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$
7-Cl-ISA	$E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,02 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,23 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,06 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,23 \text{ V}$
7-I-ISA	$E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,01 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,18 \text{ V}$
4,6-diBr-ISA	$E_{p2a} = + 1,06 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,25 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,07 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,25 \text{ V}$
5,7-diCl-ISA	$E_{p2a} = + 1,07 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,21 \text{ V}$	$E_{p1a} = + 1,09 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,22 \text{ V}$
5,7-diBr-ISA	$E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,24 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,23 \text{ V}$
5,7-F-Cl-ISA	$E_{p2a} = + 1,08 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,09 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$
5,7-Br-Cl-ISA	$E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,22 \text{ V}$	$E_{p2a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,23 \text{ V}$

4.1 Oxidação eletroquímica

A oxidação eletroquímica dos onze derivados halogenados da ISA, **Figura 4.1**, foi investigada por voltametria cíclica e, após a análise dos resultados obtidos, foram estudados por voltametria de DP e de SW os derivados 5-F-ISA e 7-I-ISA.

4.1.1 Voltametria cíclica

As experiências de voltametria cíclica realizadas em soluções de ~ 200 μM de derivados halogenados da ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), no intervalo de potencial 0,0 V até 1,3 V, permitiram avaliar a influência do número e dos diferentes átomos de halogéneo, ligados ao anel benzénico da ISA, no potencial dos picos de oxidação da ISA.

No geral, para todos os derivados halogenados observou-se a ocorrência de dois picos de oxidação irreversíveis, os picos 1a e 2a, **Figuras 4.5 e 4.6, e Tabela 4.1**. No entanto, observou-se que o número e o tipo de átomos de halogéneo afetava consideravelmente o processo de oxidação, uma vez que em alguns casos verificou-se a ocorrência de três picos de oxidação, os picos 1a, 2a e 3a. Por esta razão, os resultados obtidos por voltametria cíclica com os derivados halogenados, foram apresentados separadamente em dois grupos, o grupo dos derivados mono-halogenados, **Figura 4.5**, e o grupo dos derivados di-halogenados, **Figura 4.6**.

4.1.1.1 Derivados mono-halogenados da ISA

Os voltamogramas cíclicos dos derivados mono-halogenados da ISA foram registados em soluções de 200 μM de 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 5-Br-ISA, 5-I-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 4.4**.

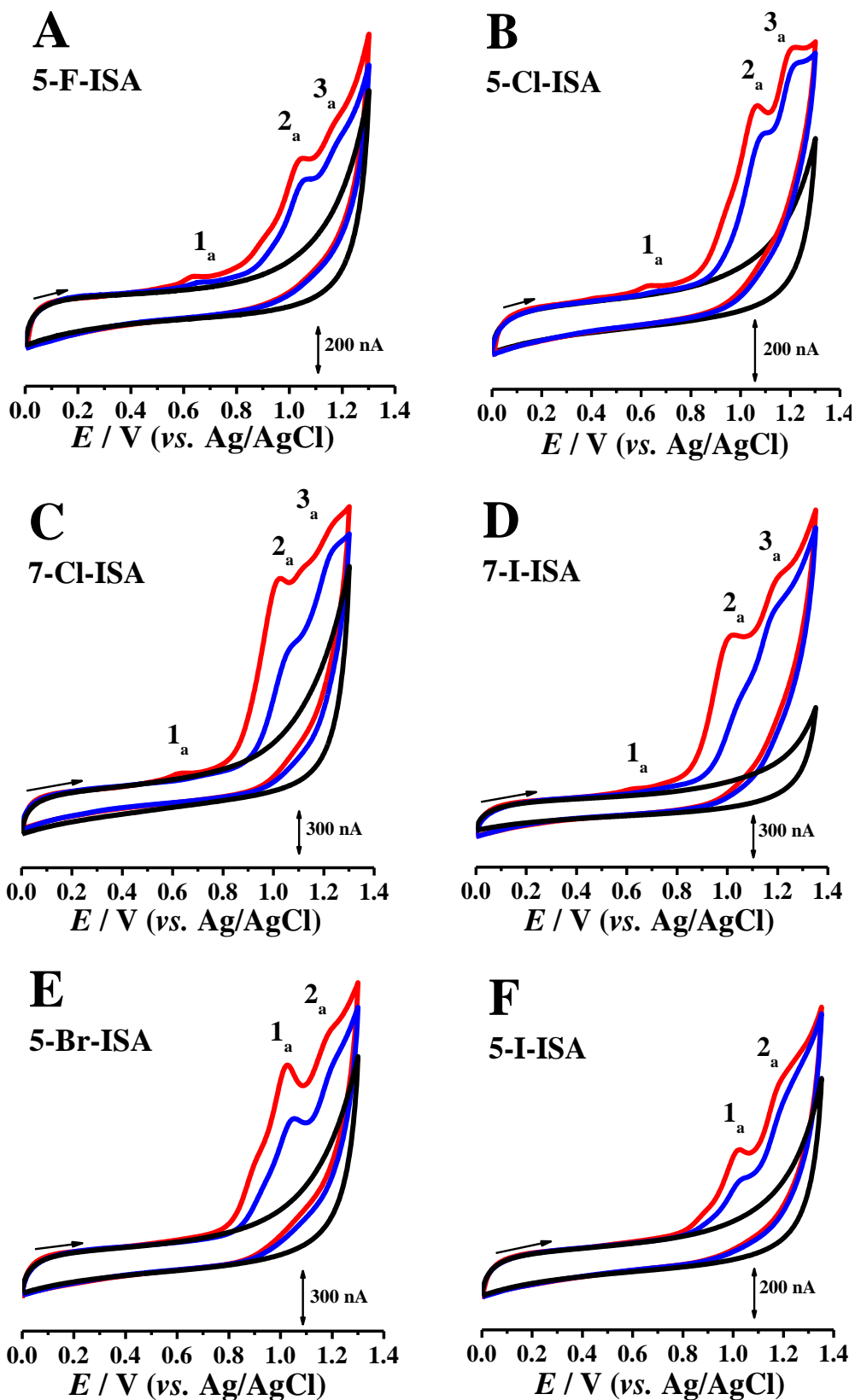


Figura 4.4 Voltamogramas cíclicos da oxidação em (—) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em soluções de ~ 200 μM de derivados mono-halogenados, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os derivados mono-halogenados 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA apresentaram três picos de oxidação, os picos 1a, 2a e 3a, **Figura 4.4 (A-D)**. Os picos 1a e 2a destes derivados ocorrem para potenciais menos positivos do que os picos de oxidação da ISA. No entanto, os derivados 5-Br-ISA e 5-I-ISA tal como a ISA, apresentam apenas dois picos de oxidação, os picos 1a e 2a, **Figura 4.4 e Tabela 3.1**.

Como representante do grupo de derivados mono-halogenados 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA, o comportamento eletroquímico da 5-F-ISA foi estudado em detalhe, por voltametria de DP e de SW.

Os voltamogramas cíclicos realizados numa solução de 200 μM 5-F-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), revelaram no primeiro varrimento três picos de oxidação irreversíveis, pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$, pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,01 \text{ V}$ e pico 3a, a $E_{p3a} = + 1,20 \text{ V}$, **Figura 4.4A**.

Foram registados varrimentos sucessivos na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE entre as medidas, e verificou-se uma diminuição na intensidade da corrente em todos os picos de oxidação. Este comportamento ocorre devido ao bloqueio da superfície do GCE e à diminuição da área disponível da superfície do eléctrodo, causada com a forte adsorção dos produtos de oxidação da 5-F-ISA.

O estudo do efeito da variação da velocidade de varrimento no processo redox da 5-F-ISA foi investigado numa solução de 200 μM de 5-F-ISA, para velocidades entre 10 e 1000 mV s^{-1} , em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), e verificou-se que aumentando a velocidade de varrimento, também aumentava a intensidade de corrente do pico 1a. De facto, este comportamento foi o esperado, uma vez que o processo de oxidação da 5-F-ISA não é controlado por difusão, pois, devido à forte adsorção da 5-F-ISA e dos seus produtos de oxidação na superfície hidrofóbica do GCE, não se verifica uma relação linear entre I_{p1a} vs. \sqrt{v} [92,245].

De um modo geral, estabelecendo uma comparação com a 5-F-ISA, a oxidação dos derivados mono-halogenados 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA é um processo que ocorre em três passos com a formação de três picos de oxidação que diminuem de intensidade de corrente com o número de varrimentos sucessivos. Este comportamento é partilhado pelos derivados mono-halogenados 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA, independentemente da posição *orto* ou *para* do átomo de halogéneo, o que permite concluir que o mecanismo de oxidação é o mesmo.

Contudo, o mesmo comportamento não se verifica para os derivados mono-halogenados 5-Br-ISA, **Figura 4.4E**, e 5-I-ISA, **Figura 4.4F**, uma vez que o processo de oxidação ocorre apenas em dois passos, com a ocorrência de dois picos de oxidação, comportamento idêntico ao processo de oxidação da ISA, **Figura 4.5A**.

4.1.1.2 Derivados di-halogenados da ISA

Os voltamogramas cíclicos dos derivados di-halogenados da ISA foram efetuados em soluções de 200 μM de 4,6-diBr-ISA, 5,7-diCl-ISA, 5,7-diBr-ISA, 5,7-F-Cl-ISA, 5,7-Br-Cl-ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 4.5**.

Na oxidação eletroquímica dos derivados di-halogenados da ISA observou-se a ocorrência de dois picos anódicos irreversíveis, os picos 1a e 2a, **Figura 4.5**, e verificou-se uma diminuição da intensidade de corrente dos picos de oxidação em voltamogramas sucessivos. Este comportamento foi também observado para a molécula de ISA sem átomos substituídos, **Figura 4.5A**.

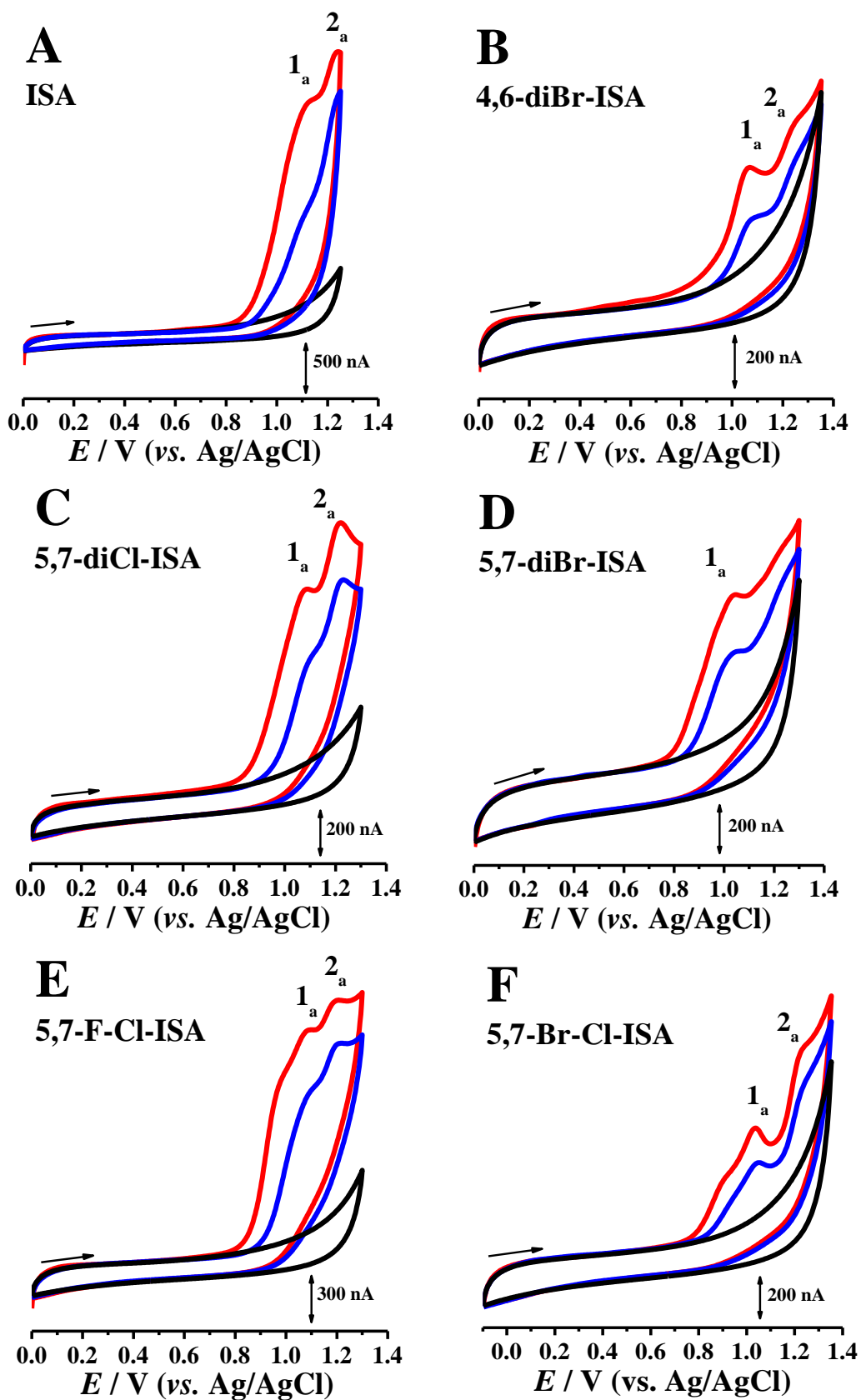


Figura 4.5 Voltamogramas cíclicos em (—) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em (A) 500 μM ISA e em soluções de $\sim 200 \mu\text{M}$ de derivados di-halogenados: (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os potenciais de oxidação dependem da natureza e da posição dos átomos de halogéneo no anel de acordo com a relação: 5,7-diCl-ISA > 5,7-F-Cl-ISA > 4,6-diBr-ISA > 5,7-Br-Cl-ISA > 5,7-diBr-ISA, **Tabela 4.1**. Estabelecendo a comparação entre os potenciais de oxidação de todos os derivados halogenados da ISA, verificou-se que a presença do segundo átomo de halogéneo dificultou o processo de oxidação **Figura 4.4 e 4.5 e Tabela 4.1**.

4.1.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

Tendo em conta os resultados de voltametria cíclica, e uma vez que alguns derivados mono-halogenados da ISA apresentam um processo redox mais complexo, os derivados mono-halogenados 5-F-ISA e 7-I-ISA foram escolhidos para serem estudados também por voltametria de DP e de SW.

4.1.2.1 5-Flúor-isatina

Os voltamogramas de DP foram registados numa solução de 20 μ M de 5-F-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e usando sempre um GCE limpo, **Figura 4.6A e Tabela 4.2**. No primeiro varrimento observou-se a ocorrência de três picos de oxidação, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,62$ V, o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,04$ V, e o pico 3a, a $E_{p3a} = + 1,16$ V. No segundo varrimento foram detetados dois novos picos de oxidação, o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,18$ V, e o pico 5a, a $E_{p5a} = + 0,39$ V. Aumentando o número de varrimentos de DP, sem limpar a superfície do GCE, observou-se que a intensidade de corrente dos picos de oxidação 4a e 5a também aumentou.

De modo a identificar se os produtos de oxidação da 5-F-ISA, os picos 4a e 5a, eram formados no pico 1a ou no pico 2a, foram efetuadas experiências de voltametria de DP em diferentes intervalos de potencial.

Numa primeira experiência, realizada com uma superfície limpa do GCE numa solução mais concentrada de 50 μM de 5-F-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), foram efetuados dois voltamogramas de DP sucessivos. O primeiro varrimento foi no intervalo de potencial de 0,0V até + 0,75V, sendo o potencial aplicado parado imediatamente depois da ocorrência do primeiro passo de oxidação, pico 1a, mas antes da ocorrência do segundo passo de oxidação, pico 2a. No segundo varrimento de DP registado imediatamente a seguir, não se observaram os picos 4a e 5a, **Figura 4.6B.**

Numa segunda experiência, realizada com uma superfície limpa do GCE numa solução de 50 μM de 5-F-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), foram efetuados dois voltamogramas de DP sucessivos, no intervalo de potencial de 0,0 V até + 1,0 V, imediatamente depois do segundo passo de oxidação, pico 2a, mas antes do terceiro passo de oxidação, pico 3a.

Tabela 4.2 Potenciais de oxidação dos derivados mono-halogenados 5-F-ISA e 7-I-ISA, obtidos por voltametria de DP a $\text{pH} = 7,0$.

Derivados halogenados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)	
	1º Varrimento	2º Varrimento
5-F-ISA	$E_{p1a} = + 0,62 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,16 \text{ V}$	$E_{p4a} = + 0,18 \text{ V}$ $E_{p5a} = + 0,39 \text{ V}$ $E_{p1a} = + 0,65 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,02 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,16 \text{ V}$
7-I-ISA	$E_{p1a} = + 0,60 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,88 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,17 \text{ V}$	$E_{p4a} = + 0,23 \text{ V}$ $E_{p1a} = + 0,63 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,91 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,16 \text{ V}$

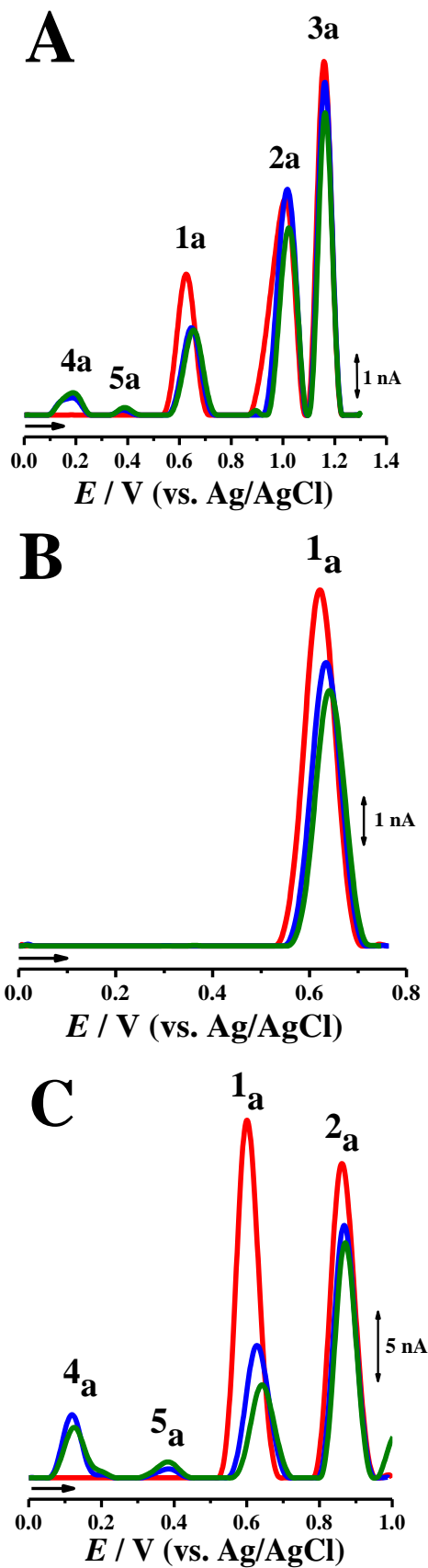


Figura 4.6 Voltamogramas sucessivos de DP numa solução de 5-F-ISA, em eletrólito inerte pH = 7,0 tampão fosfato 0,1 M: (A) 20 μ M e (B e C) 50 μ M, (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5$ mV/s.

No segundo voltamograma de DP sucessivo registaram-se os picos 4a e 5a, **Figura 4.6C**. Deste modo, ficou comprovado que os picos 4a e 5a resultam sem qualquer dúvida da oxidação dos produtos formados no segundo processo de oxidação, pico 3a, da 5-F-ISA.

A influência do pH na oxidação eletroquímica da 5-F-ISA foi estudada por voltametria de DP, em soluções de baixa concentração, 20 μM de 5-F-ISA, numa gama de eletrólitos de força iónica 0,1 M, num intervalo de pH que variou entre 2,0 e 12,0, **Tabela 2.3**, e usando sempre uma superfície limpa de GCE.

No intervalo entre $2,0 < \text{pH} < 9,0$, o potencial dos picos anódicos da 5-F-ISA deslocou-se para valores menos positivos, com o aumento do pH, **Figura 4.7**.

Em todos os casos, a inclinação das retas do gráfico E_{pa} vs. pH, **Figura 4.7B**, foi 59 mV por unidade de pH, o que significa que os três mecanismos de oxidação, pico 1a, 2a e 3a, envolvem a transferência do mesmo número de eletrões e protões. Considerando que a largura do pico a meia altura é de $W_{1/2} \approx 70$ mV para o pico 1a, $W_{1/2} \approx 93$ mV para o pico 2a e $W_{1/2} \approx 65$ mV para o pico 3a, é possível concluir que o mecanismo de oxidação de cada um dos processos envolve um eletrão e um protão. Sendo assim, a oxidação da 5-F-ISA ocorre em três etapas sucessivas, cada uma envolvendo a transferência de um eletrão e um protão.

No gráfico que representa a intensidade de corrente dos picos de oxidação da 5-F-ISA em função do pH, **Figura 4.7A** observou-se que, no intervalo entre $3,0 < \text{pH} < 7,0$, a corrente dos picos de oxidação é maior ou seja, foi possível concluir que a oxidação da 5-F-ISA é significativamente afetada pelo pH do meio.

Para $\text{pH} > 9,0$ o potencial de oxidação do pico 1a é independente do pH, e o mecanismo de oxidação passa a envolver apenas a transferência de um eletrão. A partir dos dados da **Figura 4.7B**, para a 5-F-ISA foi determinado um valor de $\text{pK}_a \sim 9$.

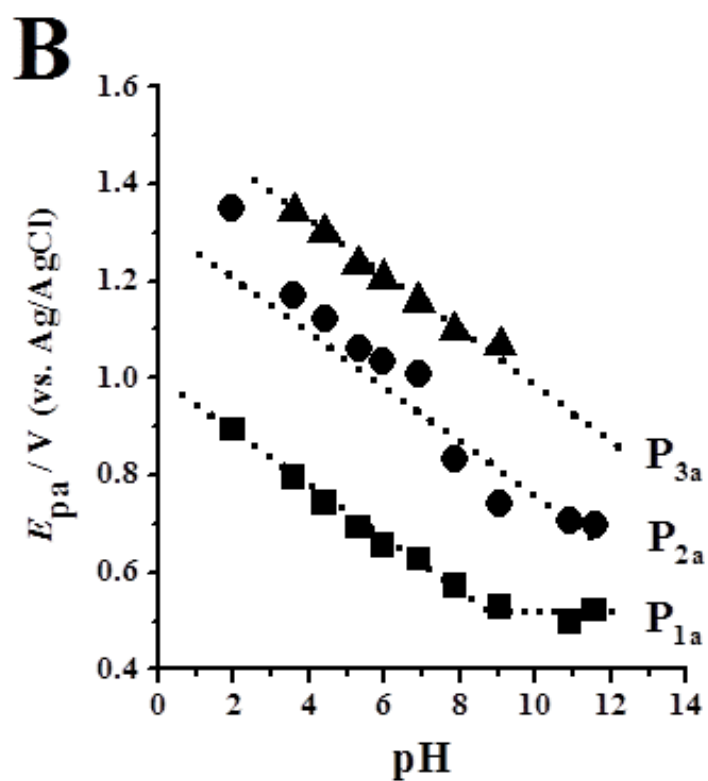
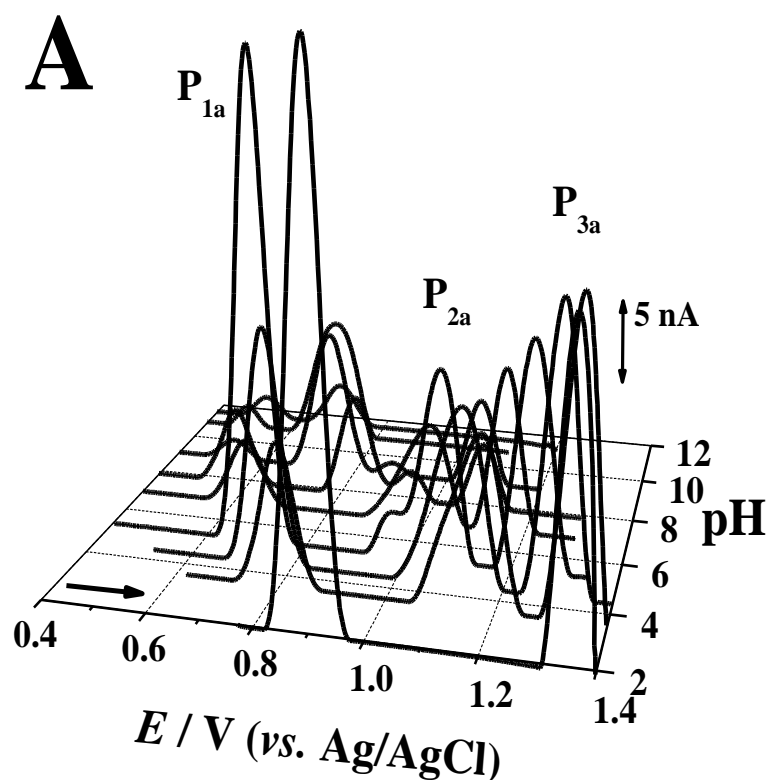


Figura 4.7 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção da linha de base, numa solução de $20 \mu\text{M}$ de 5-F-ISA, em função do pH. **(B)** Gráfico da variação de (■) E_{p1a} do pico 1a, (●) E_{p2a} do pico 2a, e (▲) E_{p3a} do pico 3a vs. pH. O declive das retas é de 59 mV por unidade de pH. $v = 5 \text{ mV/s}$.

É importante considerar as formas predominantes da 5-F-ISA e dos seus produtos de oxidação para cada pH, uma vez que se traduzem em alterações estruturais, por exemplo, nos grupos fenólicos, devido ao equilíbrio ácido-base e às variações no caráter hidrofílico que influenciam fortemente o processo da oxidação eletroquímica (através das variações de potencial e corrente dos picos) da 5-F-ISA na superfície do GCE.

4.1.2.2 7-Iodo-isatina

Os voltamogramas de DP efetuados numa solução de 20 μM 7-I-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), e mostraram um processo de oxidação de três passos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,60 \text{ V}$, o pico 2a, a $E_{p2a} = + 0,88 \text{ V}$ e o pico 3a, a $E_{p3a} = + 1,17 \text{ V}$, **Figura 4.8**.

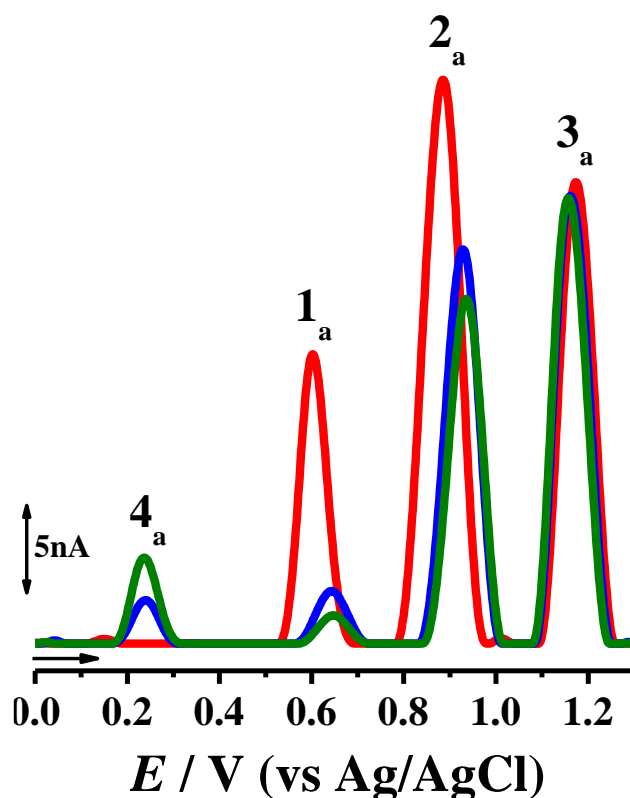


Figura 4.8 Voltamogramas sucessivos de DP numa solução de 20 μM 7-I-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M): (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5 \text{ mV/s}$.

Os voltamogramas de DP de 7-I-ISA revelaram um comportamento redox idêntico ao da 5-F-ISA. Contudo, para a 7-I-ISA, no segundo varrimento, a intensidade de corrente dos picos aumentou e, apenas se observou a formação de um novo pico anódico pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,23 \text{ V}$, **Figura 4.8**, que corresponde à oxidação dos produtos de oxidação da 7-I-ISA, formados na superfície do GCE depois do primeiro varrimento, **Tabela 4.2**.

A influência do pH na oxidação da 7-I-ISA também foi estudada por voltametria de DP, no intervalo de pH entre 2,0 e 12,0, **Tabela 2.3**, e usando sempre o GCE limpo. No intervalo entre $3,0 < \text{pH} < 9,0$ aumentando o pH do eletrólito inerte, o potencial de ambos os picos de oxidação 1a e 2a desviou-se para valores menos positivos.

As retas do gráfico E_{pa} vs. pH apresentaram uma inclinação de 59 mV por unidade de pH, ou seja, o mecanismo dos processos de oxidação 1a e 2a envolvem o mesmo número de elétrons e prótons. Tendo em conta a largura a meia altura dos picos, $W_{1/2} \approx 70 \text{ mV}$ para o pico 1a, $W_{1/2} \approx 87 \text{ mV}$ para o pico 2a, próximo do valor teórico de 90 mV, a reação de oxidação de ambos os picos envolve a transferência de um elétron e um próton. Para $\text{pH} > 8$, ambos os picos de oxidação 1a e 2a são independentes do pH, o que corresponde a uma reação eletroquímica que envolve a transferência de um elétron. O valor de $\text{p}K_a$ determinado para a 7-I-ISA foi $\text{p}K_a \sim 8$.

A forte adsorção da 7-I-ISA e dos produtos de oxidação na superfície do GCE foi analisada por voltametria de DP em diferentes eletrólitos inertes de pH, 3,5, 6,9 e 9,0, **Figura 4.9**.

O eléctrodo foi imerso durante 10 minutos numa solução de 20 μM 7-I-ISA, em cada um dos pHs, e de seguida foi lavado com um jato de água Milli-Q e transferido para uma solução de eletrólito inerte do respetivo pH.

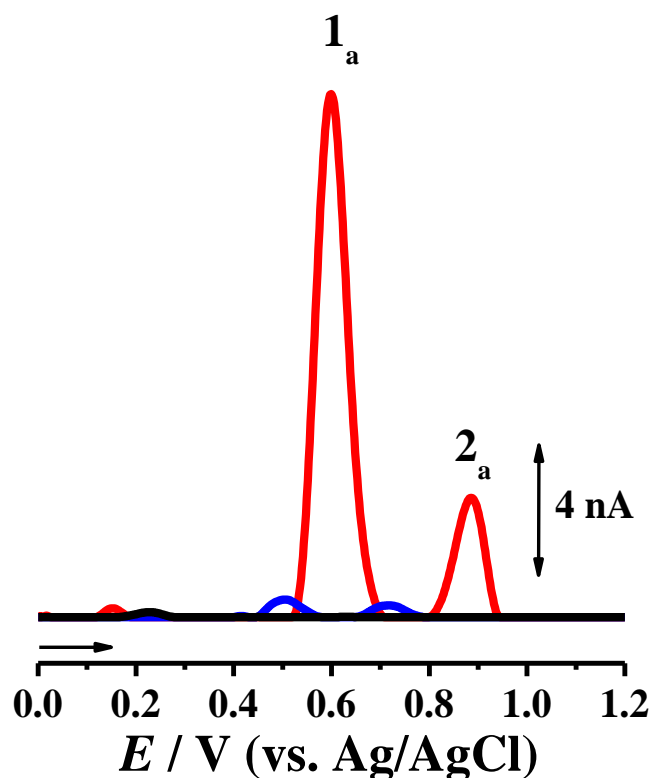


Figura 4.9 Voltamogramas DP após 10 min numa solução de 20 μM 7-I-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0: (—) a pH = 3,5 (tampão acetato 0,1 M), (—) a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M) e (—) a pH = 9,0 (tampão borato 0,1 M). $\nu = 5 \text{ mV/s}$.

A forte adsorção da 7-I-ISA ficou confirmada em meio neutro, uma vez que, foram observados os dois picos de oxidação 1a e 2a, em meio básico também se observaram os picos 1a e 2a, mas com corrente muito mais baixa, enquanto que em meio básico não se observou nenhum pico de oxidação, **Figura 4.9**.

4.1.3 Voltametria de onda quadrada

Para além das vantagens já mencionadas, a voltametria de SW permite também velocidades de varrimento mais elevadas, o que se traduz no consumo reduzido de espécies eletroativas relativamente à voltametria de DP, minimizando assim os problemas relacionados com a adsorção na superfície do GCE [245]. As experiências de SW foram realizadas a $\nu_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e permitiram confirmar os mecanismos de oxidação dos derivados mono-halogenados 5-F-ISA e da 7-I-ISA.

4.1.3.1 5-Flúor-ISA

No primeiro voltamograma de SW numa solução de 20 μM 5-F-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), observou-se um processo de oxidação da 5-F-ISA que envolve dois passos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,64$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,03$ V, **Figura 4.10A**. A irreversibilidade dos picos 1a e 2a foi confirmada através da representação gráfica das componentes direta e inversa da corrente total, **Figura 4.10A**.

No segundo voltamograma de SW registado imediatamente a seguir, sem limpar o GCE, observou-se a ocorrência de dois picos de oxidação reversíveis, o pico 4a a $E_{p4a} = + 0,19$ V e o pico 5a a $E_{p5a} = + 0,34$ V, que correspondem à oxidação reversível dos produtos de oxidação da 5-F-ISA, **Figura 4.10B**.

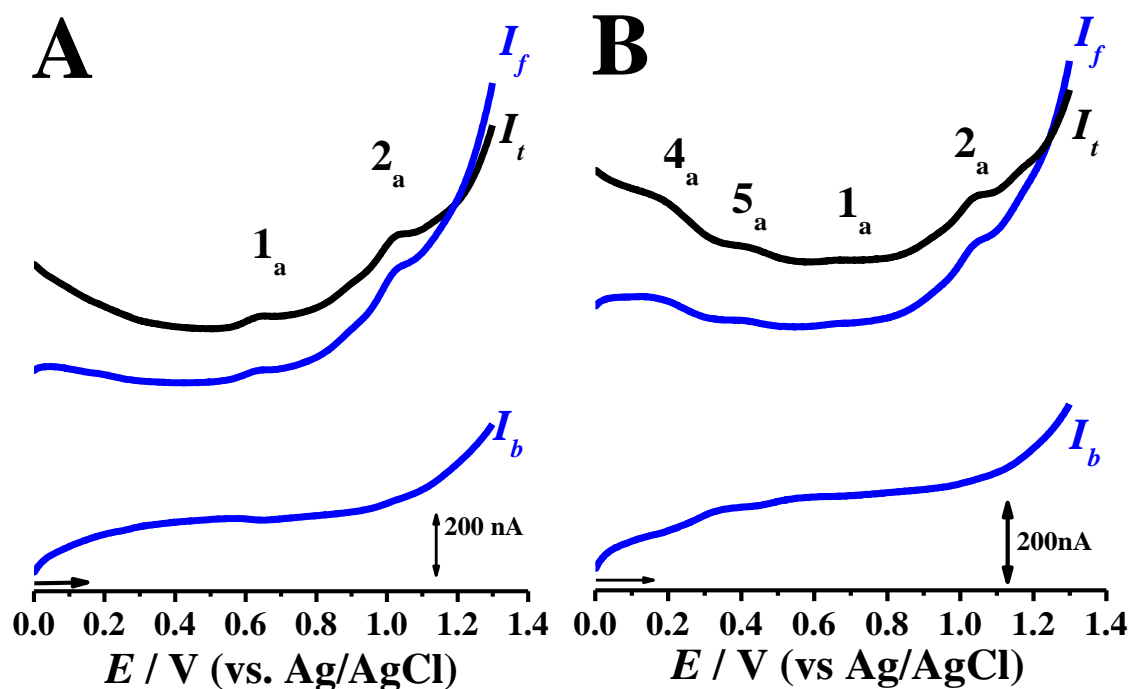


Figura 4.10 Voltamogramas de SW em electrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), em soluções de 20 μM 5-F-ISA: (A) primeiro e (B) terceiro varrimentos, $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2\text{mV}$, $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso 50 mV; (—) I_t – corrente total, (—) I_f – corrente direta, (—) I_b – corrente inversa.

O pico anódico 3a ocorre a um potencial positivo muito elevado, próximo do potencial correspondente à evolução do oxigénio, e conseqüentemente não foi possível detetar por voltametria de SW.

A mesma experiência foi realizada, numa solução de 20 μM 7-I-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), e no primeiro voltamograma de SW, observou-se que o processo de oxidação da 7-I-ISA ocorreu em dois passos, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 0,64 \text{ V}$, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,03 \text{ V}$, confirmando assim os resultados da voltametria de DP, **Figura 4.11A e B**.

No primeiro varrimento de SW ficou ainda confirmada a irreversibilidade dos picos 1a e 2a, e no terceiro varrimento de SW, sem limpar o GCE, verificou-se a ocorrência do pico de oxidação reversível, pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,64 \text{ V}$, que corresponde à oxidação dos produtos de oxidação da 7-I-ISA, **Figura 4.11A e B**.

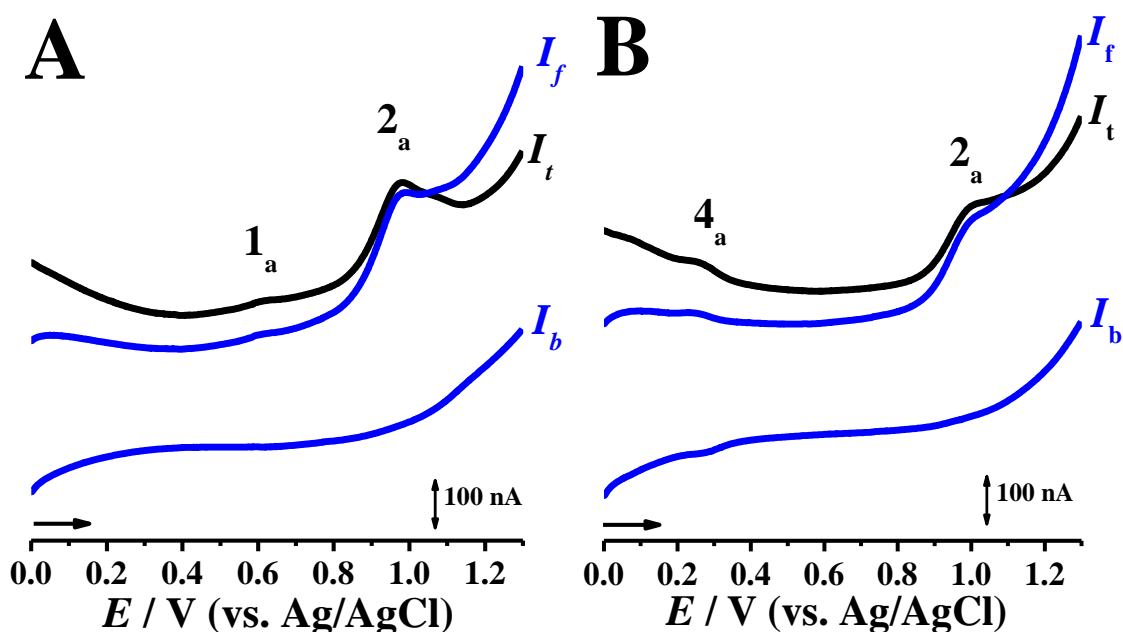


Figura 4.11 Voltamogramas de SW em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), em soluções de 20 μM 7-I-ISA: **(A)** primeiro e **(B)** terceiro varrimentos; $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2\text{mV}$, $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso 50 mV; $(\text{—}) I_t$ – corrente total, $(\text{—}) I_f$ – corrente direta, $(\text{—}) I_b$ – corrente inversa.

4.1.4 Mecanismo de oxidação

A oxidação dos derivados substituídos na estrutura anelar da ISA, com um ou mais átomos de halogéneo F, Cl, Br e I, apresenta de um modo geral, processos de oxidação semelhantes. A oxidação dos derivados halogenados ocorre em passos sucessivos no anel benzénico da ISA, e foi influenciada pelo número e posição de átomos de halogéneo na molécula da ISA, obtendo-se produtos de oxidação com comportamento eletroativo reversível. Para simplificar a análise dos mecanismos de oxidação, os derivados foram separados em função do número e posição do grupo halogéneo substituinte.

4.1.4.1 Derivados 5 (ou 7)-mono-halogenados da ISA

O mecanismo de oxidação proposto para os derivados 5 (ou 7)-mono-halogenados da ISA, **Figura 4.12**, foi baseado nos resultados obtidos por voltametria cíclica, de DP e de SW, e também nos mecanismos de oxidação da ISA [27,92] e dos compostos fenólicos [28,105,107,276]. A reação de oxidação dos derivados mono-halogenados, 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA, substituídos com um átomo de halogénio na posição C5 ou C7, ocorre no anel benzénico da ISA e em três passos consecutivos. No primeiro passo, pico 1a, um eletrão é removido do anel benzénico, que depois sofre uma desprotonação e um ataque nucleofílico por parte da água, produzindo-se 7-OH-5-ISA mono-halogenada ou 4-OH-7-ISA mono-halogenada.

No segundo passo de oxidação, pico 2a, ocorre a oxidação do grupo 7-OH ou 4-OH, produzido durante o primeiro passo de oxidação, pico 1a, que dá origem ao pico 4a, um derivado *para*-quinona, e ao pico 5a, um derivado *orto*-quinona. O pico 3a, que ocorre devido à oxidação dos produtos de oxidação poliméricos formados no segundo passo, pico 2a, já foi confirmado por voltametria de DP, **Figuras 4.6 A e B**.

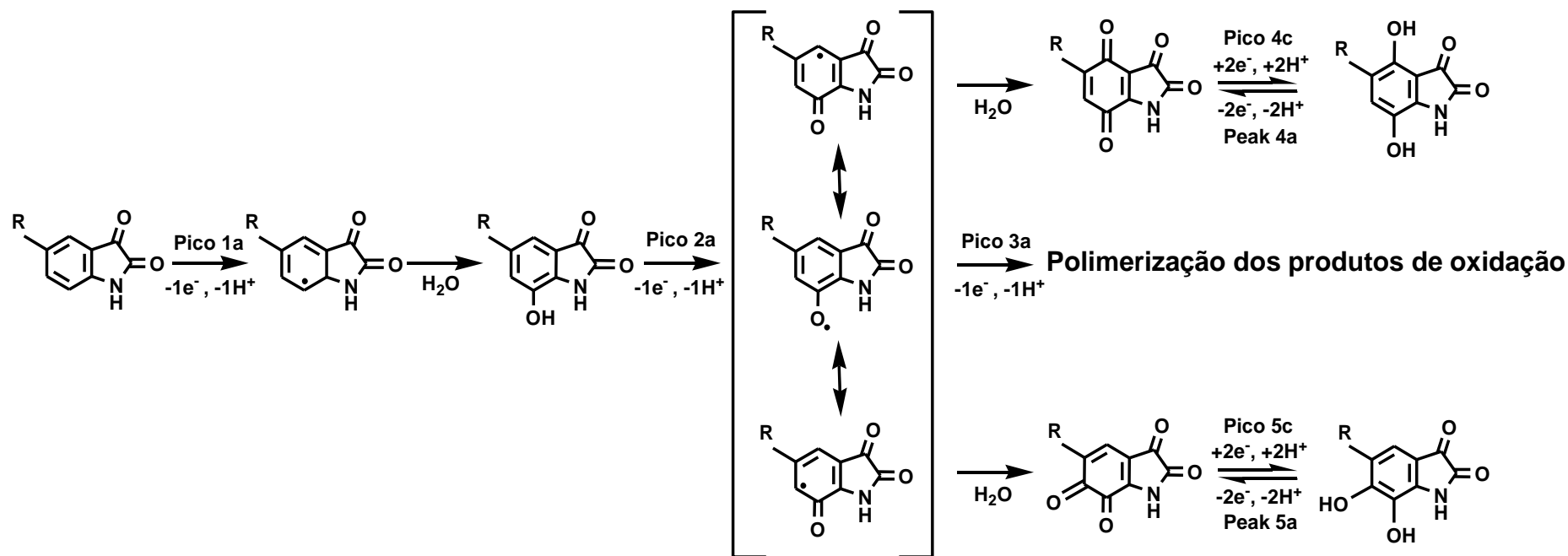


Figura 4.12 Esquema do mecanismo proposto para a oxidação dos derivados halogenados da ISA (R = F, Cl, Br e I).

O processo de oxidação do grupo fenólico da ISA ocorre num único passo, com a transferência de um eletrão e um protão, e a formação de um radical fenóxido instável, com três formas isoméricas. A maior densidade eletrónica deste radical fenóxido está localizada nas posições *orto* e *para*, sendo a posição *meta* não favorável para nenhum tipo de reação química [277].

A estabilização do radical fenóxido, por ressonância favorece a introdução de grupos hidroxilo nas posições *orto* e *para* do anel benzénico e a formação de dois produtos, que são imediatamente oxidados devido ao elevado potencial aplicado no momento da oxidação do grupo fenol. Os dois produtos de oxidação sofrem redução eletroquímica reversível, num mecanismo que envolve a perda de dois eletrões e dois protões. O terceiro passo na oxidação dos derivados 5 (ou 7)-mono-halogenados da ISA corresponde ao pico 3a, a polimerização dos produtos de oxidação que estão fortemente adsorvidos na superfície do GCE. As velocidades de reação dos dois passos do processo de oxidação dependem da posição do átomo de halogéneo na molécula da ISA,

Figura 4.12.

Diferente do resto dos derivados mono-halogenados da ISA, os derivados mono-halogenados 5-Br-ISA e 5-I-ISA, apresentam o mesmo processo de oxidação da ISA e dos derivados di-halogenados, uma vez que apresentam uma oxidação que ocorre em apenas dois passos e para potenciais elevados e mais estáveis em comparação com os derivados 5-Cl-ISA, 5-F-ISA, 7-Cl-ISA e 7-I-ISA.

4.1.4.2 Derivados di-halogenados da ISA

No caso dos derivados di-halogenados da ISA, a presença do segundo átomo de halogéneo no anel benzeno da ISA dificulta o processo de oxidação e os picos de oxidação 1a e 2a ocorrem para potenciais muito mais elevados, em comparação com os derivados mono-halogenados. A reação de oxidação principal ocorre devido à uma

competição entre os efeitos eletrônicos e estéricos, e corresponde à formação de produtos poliméricos do radical fenóxido.

Na oxidação dos derivados di-halogenados, os voltamogramas cíclicos, de DP e de SW não detetaram a ocorrência de picos relativos aos derivados do tipo quinona. A presença de dois átomos de halogéneo provoca a perda da carga negativa do átomo de oxigénio do anião fenóxido, o que faz com que estes derivados sejam ácidos mais fortes em comparação com os derivados mono-halogenados. Este efeito é mais forte nos isómeros de derivados que possuem os átomos de halogéneo mais perto do grupo OH.

O desvio dos potenciais dos picos de oxidação 1a e 2a, para valores mais positivos, relativamente aos derivados mono-halogenados, ocorre devido ao efeito de estabilização causado pelo segundo átomo ligado ao anel benzeno da ISA, o que dificulta a remoção de eletrões nos derivados di-halogenados [274,278].

Para todos os derivados halogenados da ISA estudados, verificou-se a polimerização do radical fenóxido da ISA, que dá origem a produtos de oxidação, que ficam adsorvidos fortemente na superfície do GCE, como se pode comprovar com a diminuição da corrente nos voltamogramas cíclicos e de DP. Por outro lado, podem ser oxidados e dar origem a derivados *para*-quinona, pico 4c, e/ou *orto*-quinona, pico 5c, que são depois reduzidos reversivelmente. As velocidades da reação de oxidação dependem sempre do número e posição do átomo de halogéneo na molécula da ISA.

4.2 Redução eletroquímica

O processo de redução dos onze derivados halogenados da ISA foi investigado por voltametria cíclica, **Figuras 4.13 e 4.14 e Tabela 4.2**. Além disso, a redução eletroquímica do derivado 5-F-ISA também foi investigada por voltametria de DP, **Figuras 4.15**, e de SW, **Figura 4.16**.

4.2.1 Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos sucessivos, obtidos no intervalo de potencial entre 0,0 V e - 1,2 V, foram registados em soluções de 200 μM de todos os derivados halogenados da ISA, saturadas de N_2 , em eletrólito inerte a pH 0 7,0 (tampão fosfato 0.1), **Figuras 4.13 e 4.14 e Tabela 4.2.**

No primeiro voltamograma cíclico verificou-se, para todos os derivados halogenados da ISA, a existência de um pico de redução reversível, pico 6c, a $E_{p6c} \sim - 0,50 \text{ V}$, **Figuras 4.13 e 4.14 e Tabela 4.2.** No varrimento seguinte, a intensidade da corrente do pico 6c diminuiu devido à adsorção, dos produtos de redução dos derivados halogenados da ISA, na superfície do GCE. O pico de redução, pico 6c, ocorre devido à transferência do eletrão para o sistema quinóide da ISA, e de seguida ocorre a transferência do eletrão para o grupo C-X e a clivagem da ligação carbono-halogéneo, nas posições C5, C6 ou C7 [274].

Os derivados mono-halogenados 5-Cl-ISA, 5-F-ISA, 7-I-ISA e di-halogenado 4,6-Br-ISA apresentaram um processo de redução de dois passos. O primeiro passo de redução corresponde à formação do pico 6c anteriormente descrito, a $E_{p6c} \sim - 0,50 \text{ V}$, e no segundo passo observou-se um novo pico catódico irreversível, pico 7c, a $E_{p7c} \sim - 0,78 \text{ V}$, **Figuras 4.13 e Tabela 4.2,** que ocorre devido à redução do grupo carbonilo na posição C3 do anel pirrol [27,92]. No segundo varrimento, a intensidade de corrente de ambos os picos catódicos 6c e 7c diminui, devido à adsorção, na superfície do GCE, dos produtos de redução, **Figura 4.13.**

Os derivados mono-halogenados 5-Br-ISA e 5-I-ISA e di-halogenados 5,7-diCl-ISA, 5,7-diBr-ISA, 5,7-F-Cl-ISA e 5,7-Br-Cl-ISA apresentaram um processo de redução num só passo, pico catódico 6c, uma vez que o pico catódico pico 7c não foi detetado.

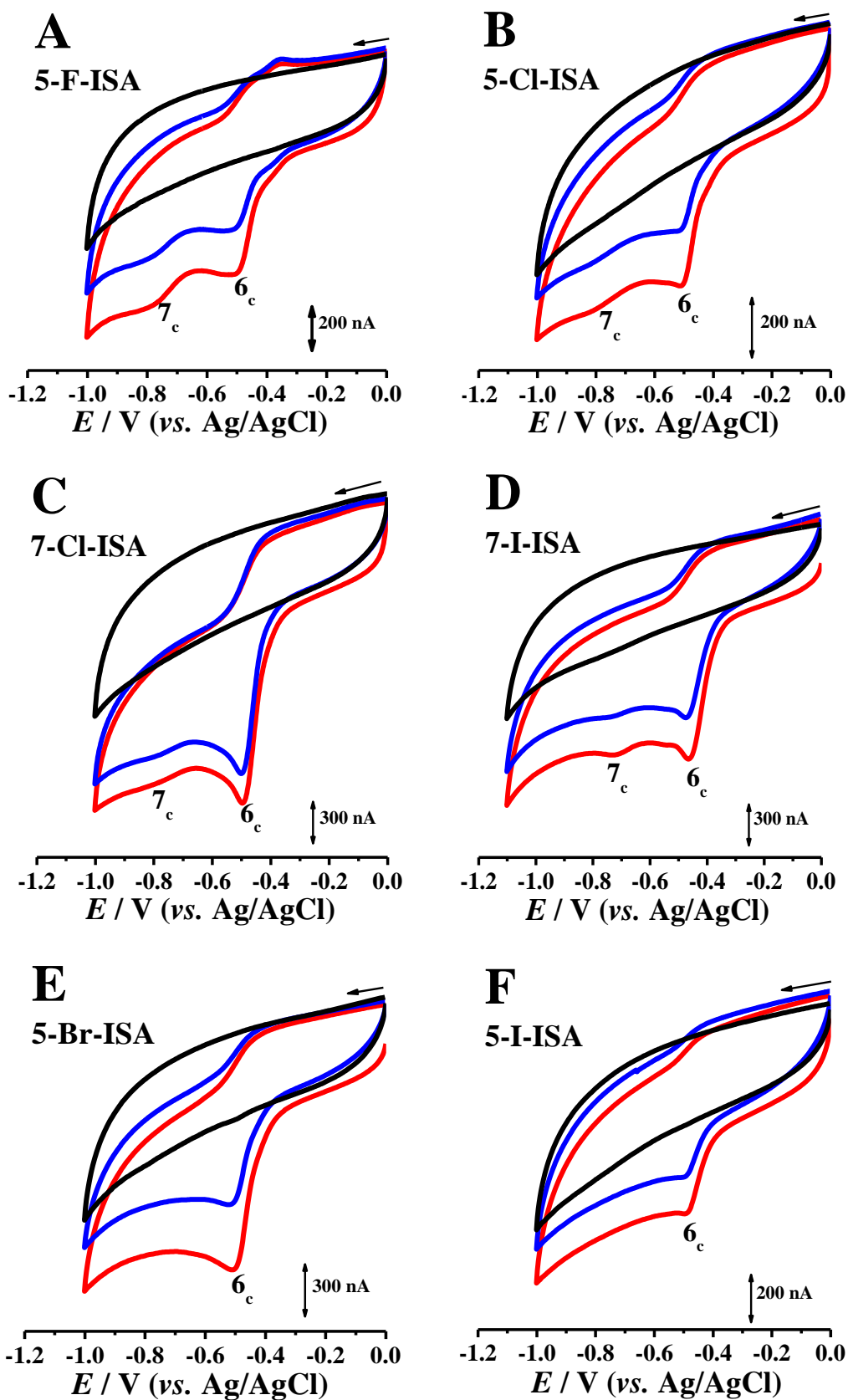


Figura 4.13 Voltamogramas cíclicos da redução, em (—) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em soluções de ~ 200 μM de derivados mono-halogenados, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

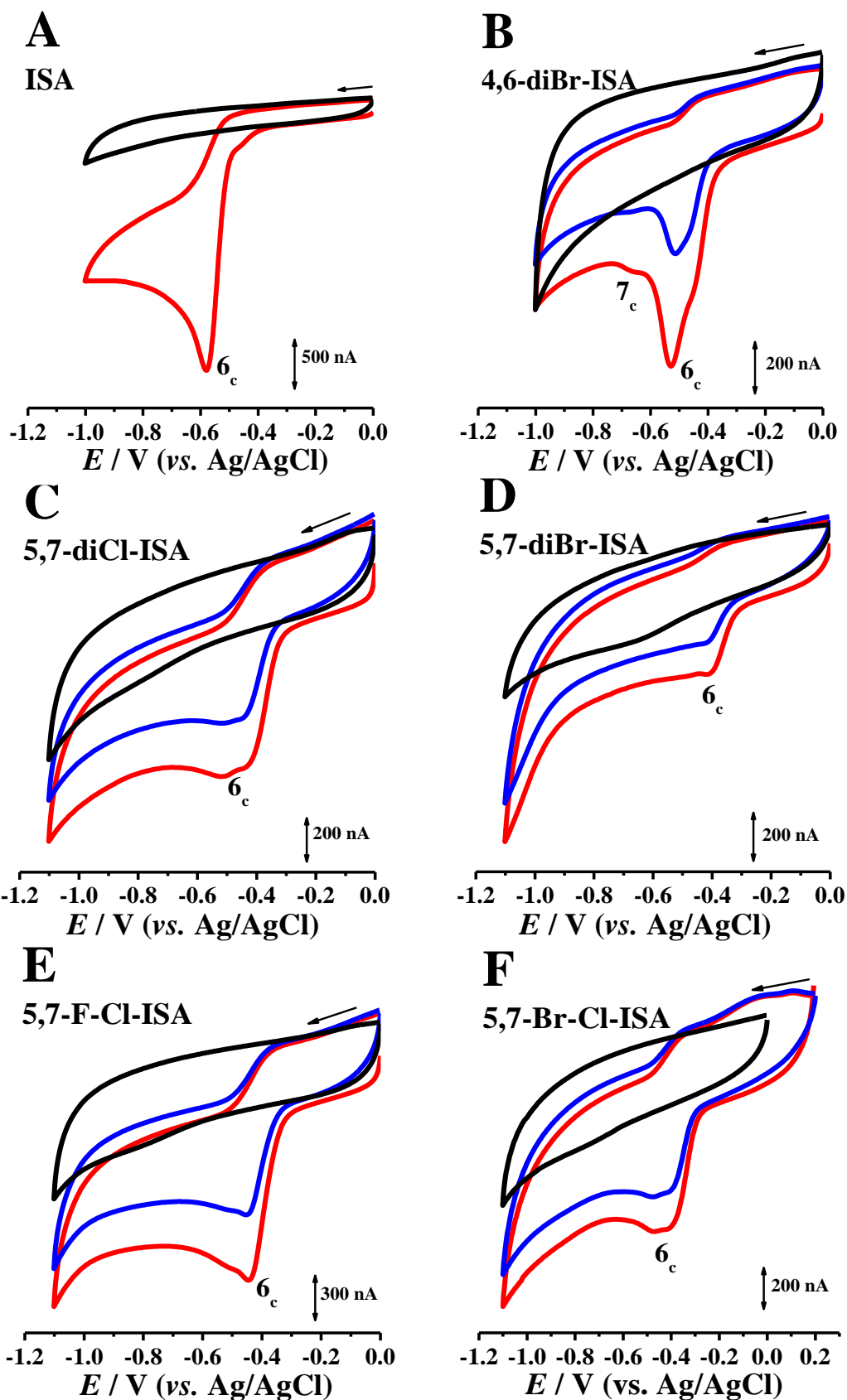


Figura 4.14 Voltamogramas cíclicos de redução em (—) eletrólito inerte, pH = 7,0 tampão fosfato 0.1 M, em (A) 500 μ M ISA e em soluções de \sim 200 μ M de derivados di-halogenados: (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 4.2 Potenciais de redução da ISA e dos derivados halogenados da ISA, obtidos por voltametria cíclica, a pH = 7,0.

Derivados halogenados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)	
	1º Varrimento	2º Varrimento
ISA	$E_{p6c} = - 0,58 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,60 \text{ V}$
5-F-ISA	$E_{p6c} = - 0,50 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,78 \text{ V}$ $E_{p8a} = - 0,36 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,78 \text{ V}$ $E_{p8a} = - 0,36 \text{ V}$ $E_{p8c} = - 0,38 \text{ V}$
5-Cl-ISA	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,80 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$
5-Br-ISA	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,52 \text{ V}$
5-I-ISA	$E_{p6c} = - 0,49 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,49 \text{ V}$
7-Cl-ISA	$E_{p6c} = - 0,49 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,50 \text{ V}$
7-I-ISA	$E_{p6c} = - 0,47 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,74 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,48 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,73 \text{ V}$
4,6-diBr-ISA	$E_{p6c} = - 0,53 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,67 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$ $E_{p7c} = - 0,67 \text{ V}$
5,7-diCl-ISA	$E_{p6c} = - 0,52 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,51 \text{ V}$
5,7-diBr-ISA	$E_{p6c} = - 0,40 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,41 \text{ V}$
5,7-F-Cl-ISA	$E_{p6c} = - 0,48 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,48 \text{ V}$
5,7-Br-Cl-ISA	$E_{p6c} = - 0,42 \text{ V}$	$E_{p6c} = - 0,47 \text{ V}$

A presença de um dos átomos de halogéneo Br e I na posição C5 do anel benzénico da ISA ou a presença de um segundo átomo de halogéneo na molécula da ISA dificulta a redução do grupo carbonilo dos derivados halogenados.

Em voltametria cíclica numa solução de 500 μM de ISA, foi observada a ocorrência de apenas um pico catódico, pico 7c, a $E_{p7c} = -0,58 \text{ V}$, **Figura 4.14A**. Este comportamento é explicado com base na concentração muito elevada de 500 μM de ISA, e que faz com que os produtos de redução associados ao pico 7c sejam adsorvidos na superfície do GCE, diminuindo a área de eletrodo disponível para o segundo processo. Os voltamogramas de SW registados numa solução de 20 μM de ISA confirmaram que o processo de redução eletroquímica da ISA ocorre em dois passos, como será descrito a seguir, **Figura 4.16B**.

4.2.2 Voltametria de impulso diferencial. Influência do pH

A influência do pH na redução eletroquímica da 5-F-ISA foi estudada em soluções de baixa concentração, usando voltametria de DP, numa gama de eletrólitos que variou entre $2,0 < \text{pH} < 12,0$, **Tabela 2.3**, e usando sempre uma superfície limpa de GCE. Os voltamogramas de DP em soluções de 20 μM de 5-F-ISA mostraram dois picos catódicos sucessivos, pico 6c e pico 7c, **Figura 4.15A**, em eletrólitos de $\text{pH} < 8,0$.

No intervalo entre $2,0 < \text{pH} < 8,0$, o processo de redução é linearmente dependente do pH para os dois picos, **Figura 4.15A**. Tendo em conta o declive do gráfico E_{pa} vs. pH, de 59 mV por unidade de pH, e a largura a meia altura dos picos, $W_{1/2} \sim 74 \text{ mV}$ para o pico 6c e $W_{1/2} \sim 92 \text{ mV}$ para o pico 7c, concluiu-se que ambos os processos 6c e 7c ocorrem com a transferência de um eletrão e um protão. Aumentando o pH do eletrólito inerte, o potencial de ambos os picos de redução desviou-se para valores mais negativos, **Figura 4.15**.

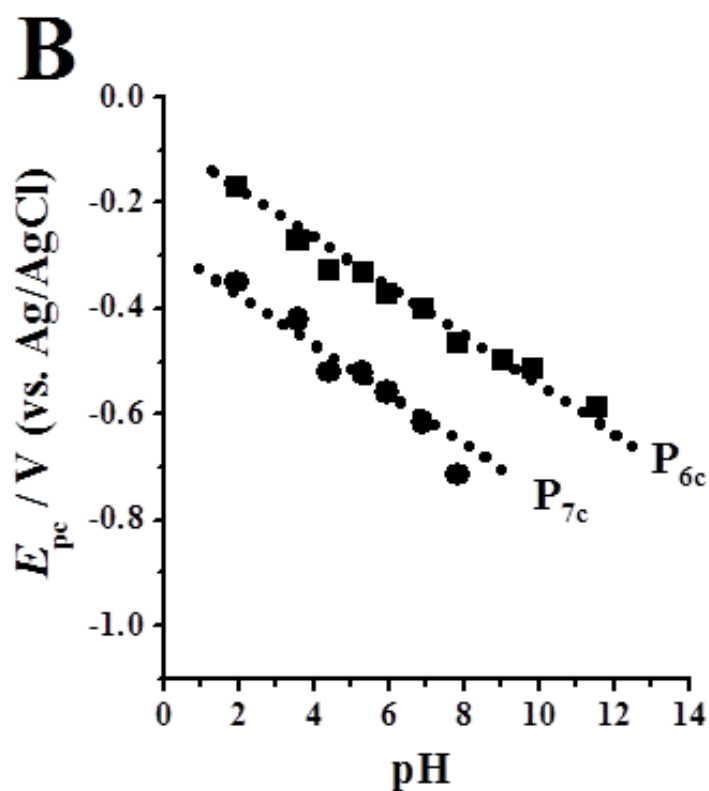
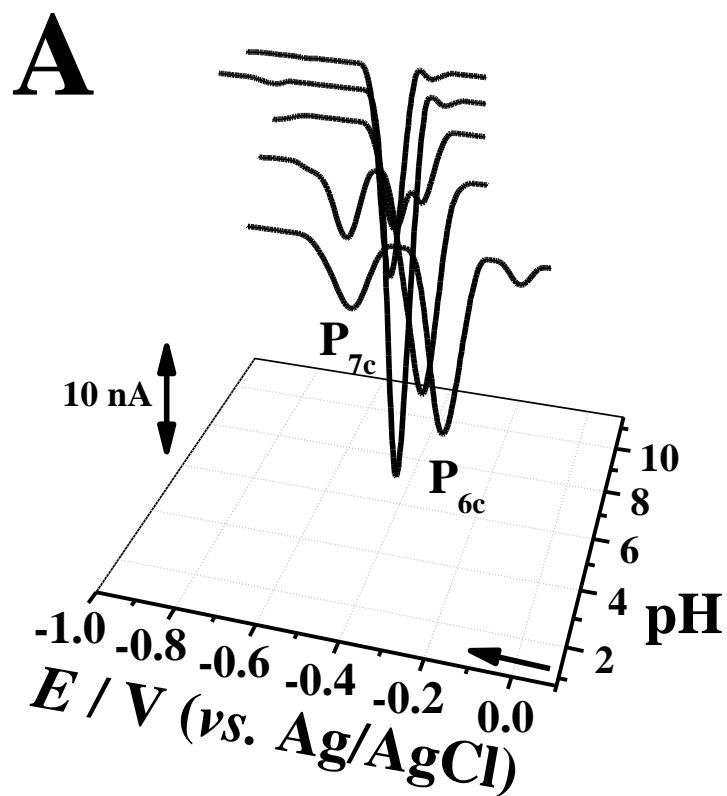


Figura 4.15 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com correção da linha de base, numa solução de $20 \mu\text{M}$ 5-F-ISA, em função do pH. (B) Gráfico da variação de (\blacksquare) E_{p6c} e (\bullet) E_{p7c} vs. pH. O declive da reta é de 59 mV por unidade de pH. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.3 Voltametria de onda quadrada

Com o intuito de clarificar alguns aspetos dos mecanismos de redução da 5-F-ISA e/ou dos outros derivados halogenados da ISA, foram efetuados voltamogramas de SW seguidos em soluções de 5-F-ISA e ISA, **Figura 4.16**.

O primeiro voltamograma de SW efetuado numa solução de 20 μM de 5-F-ISA, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), revelou um processo de redução eletroquímica que ocorre em dois passos consecutivos, o pico 6c, a $E_{p6c} = -0,41 \text{ V}$, e o pico 7c, a $E_{p7c} = -0,70 \text{ V}$, **Figura 4.16A**, resultado igual ao obtido por voltametria cíclica e de DP. Após observar as componentes direta e inversa da corrente total, confirmou-se a reversibilidade do pico 6c e a irreversibilidade do pico 7c da redução da 5-F-ISA, **Figura 4.16A**.

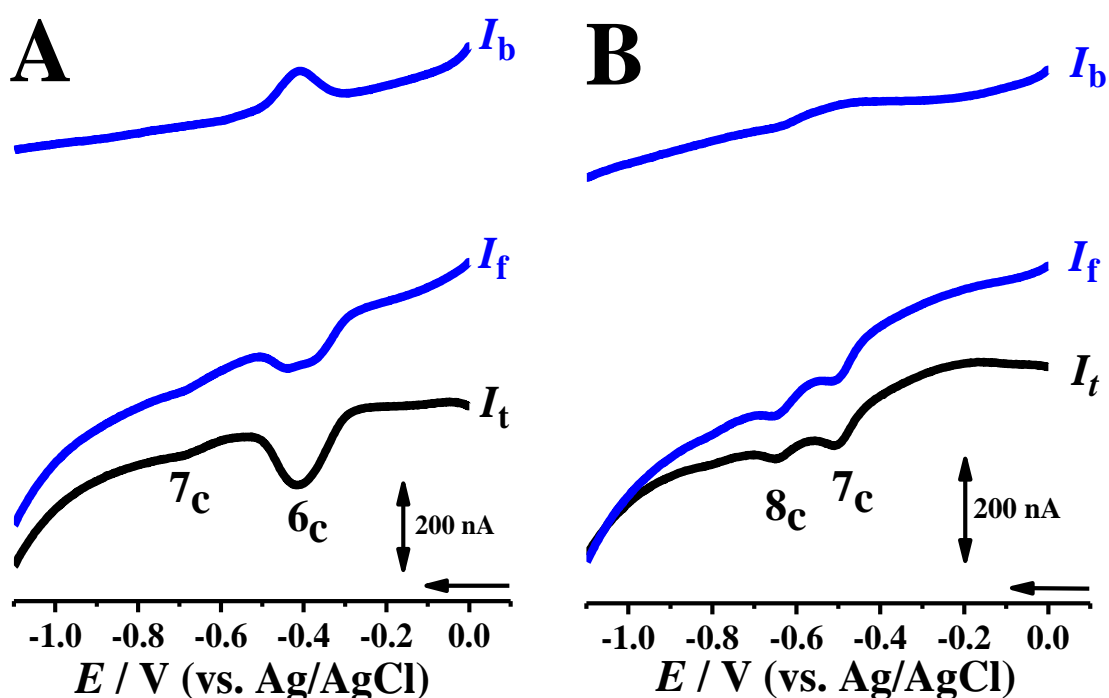


Figura 4.16 Voltamogramas de SW, em soluções de 20 μM : (A) 5-F-ISA e (B) ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M); $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, amplitude de pulso 50 mV, $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (—) I_t – corrente total, (—) I_f – corrente direta, (—) I_b – corrente inversa.

No caso da ISA, no primeiro voltamograma de SW registado numa solução de 20 μM de ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), verificou-se a existência de dois picos irreversíveis, o pico 7c, a $E_{p7c} = -0,50$ V, associado à redução do grupo carbonilo, e o pico 8c a $E_{p8c} = -0,64$ V, associado à redução do dímero isatina, formado na superfície do GCE, **Figura 4.16B** [27]. A voltametria de SW confirmou que de facto, na redução da 5-F-ISA, o pico 6c, está associado à clivagem da ligação carbono-halogéneo, quando comparado com a redução da ISA que não apresenta o pico 6c. O segundo processo de redução da 5-F-ISA é o primeiro processo de redução da ISA, pico 7c, que está associado com a redução do grupo carbonilo na posição C3. Estes resultados também confirmam que, a presença do átomo de halogéneo no anel benzeno da ISA, dificulta a redução do grupo carbonil dos derivados halogenados, em comparação com os resultados obtidos para a molécula da ISA.

4.3 Conclusões

O comportamento voltamétrico de onze derivados halogenados da ISA foi investigado por voltametria cíclica, de DP e de SW, na superfície do GCE, e os seus mecanismos redox foram propostos.

Os resultados observados permitiram concluir que os átomos de halogéneo, ligados ao anel benzeno da ISA, influenciam fortemente os mecanismos de oxidação e redução, inclusive, ocorrem novos processos redox, quando comparado com a ISA.

Relativamente à ISA, verificou-se que os derivados mono-halogenados, na posição C5 ou C7, aumentam o carácter dador de eletrões, enquanto que os derivados com dois átomos de halogéneo nas posições C5, C7 e C4, C6, diminuem o carácter dador de eletrões. A natureza, o número e a posição dos átomos de halogénio no anel benzénico dá origem a pequenas variações nos mecanismos redox destes compostos.

CAPÍTULO 5

**Estudo Voltamétrico de Derivados da
Isatina Substituídos com 1-morfolino,
1-hidroximetil, 1-metil e as suas
Formas Halogenadas**

Neste capítulo são apresentados os processos de oxidação e redução de treze derivados da ISA, substituídos principalmente na posição C1, com os grupos funcionais morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas com átomos de halogéneo, Cl, F, Br e I, na posição C5, **Figura 5.1**. As moléculas foram investigadas por voltametria cíclica, de DP e de SW, no GCE, e foram propostos os seus mecanismos redox [91].

O estudo voltamétrico dos derivados da ISA substituídos com morfolino, metil e as suas formas halogenadas, **Figura 5.1**, foi realizado na superfície do GCE, por voltametria cíclica, com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, em soluções preparadas em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), saturadas de N_2 . Durante as experiências voltamétricas, foi mantido um fluxo constante de N_2 à superfície da célula, de modo a evitar a difusão do O_2 atmosférico para o interior da solução.

Todos os derivados da ISA substituídos com morfolino, hidroximetil e metil e as suas formas halogenadas apresentaram picos eletroativos de oxidação e redução, **Figuras 5.2, 5.3 e 5.7 e Tabelas 5.1 e 5.2**. No entanto, tal como nos derivados nitrogenados e halogenados, os processos redox observados foram independentes entre si, tendo sido investigados separadamente.

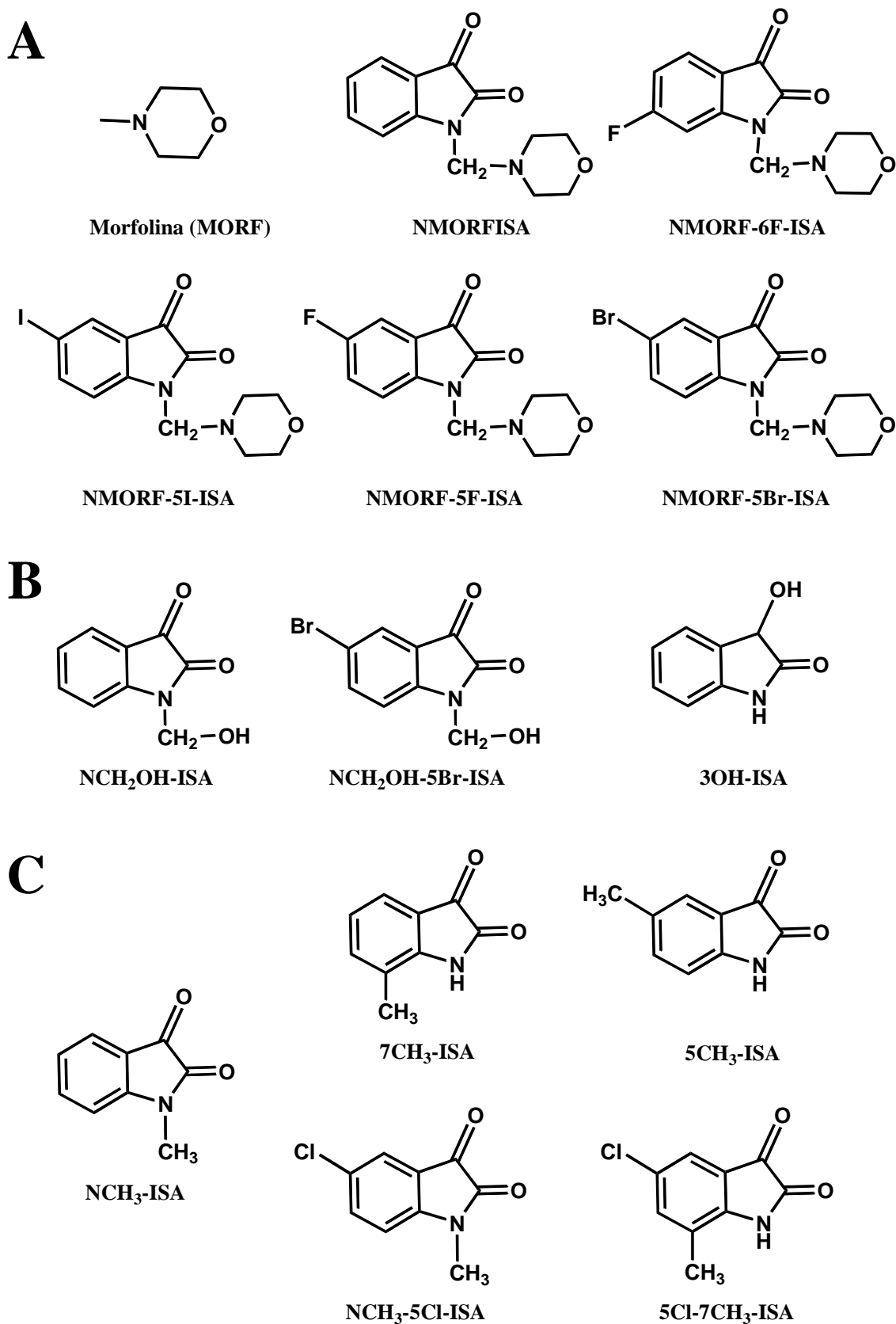


Figura 5.1. Estruturas químicas de derivados da ISA com os grupos funcionais: (A) 1-morfolinometil, (B) 1-hidroximetil e (C) 1, 5 ou 7-metil e as suas formas halogenadas.

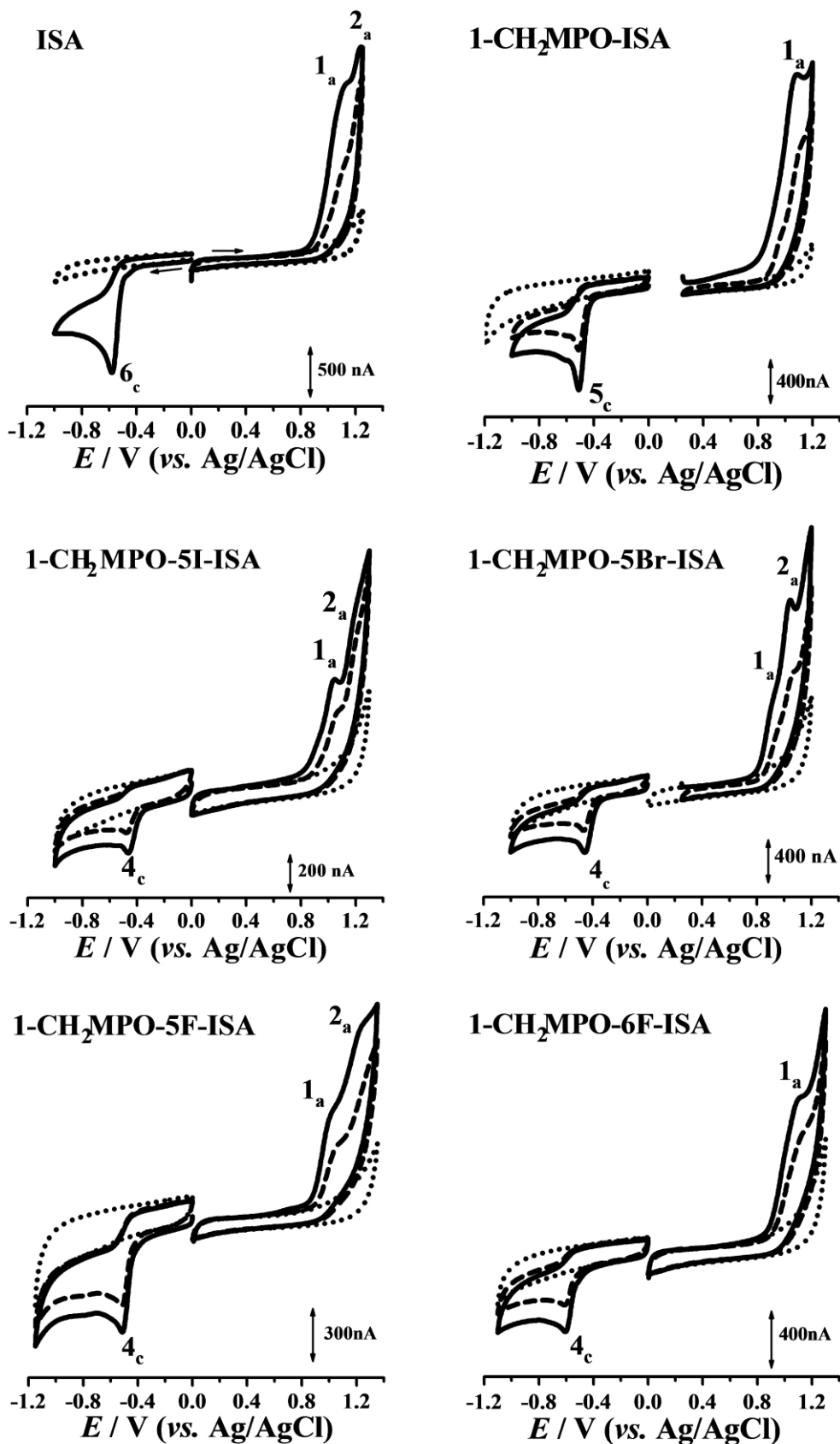


Figura 5.2 Voltamogramas cíclicos em (•••) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂, da ISA, de derivados 1-morfolino e dos seus derivados halogenados, (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

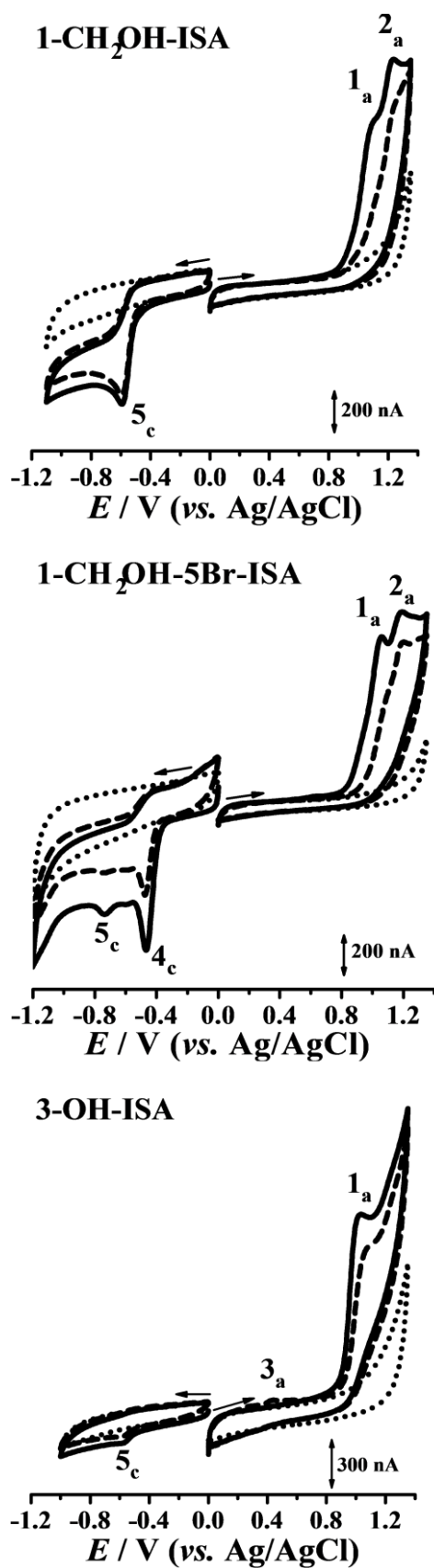


Figura 5.3 Voltamogramas cíclicos em (•••) eletrólito inerte a pH = 7,2 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de derivados 1-hidroximetil, (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

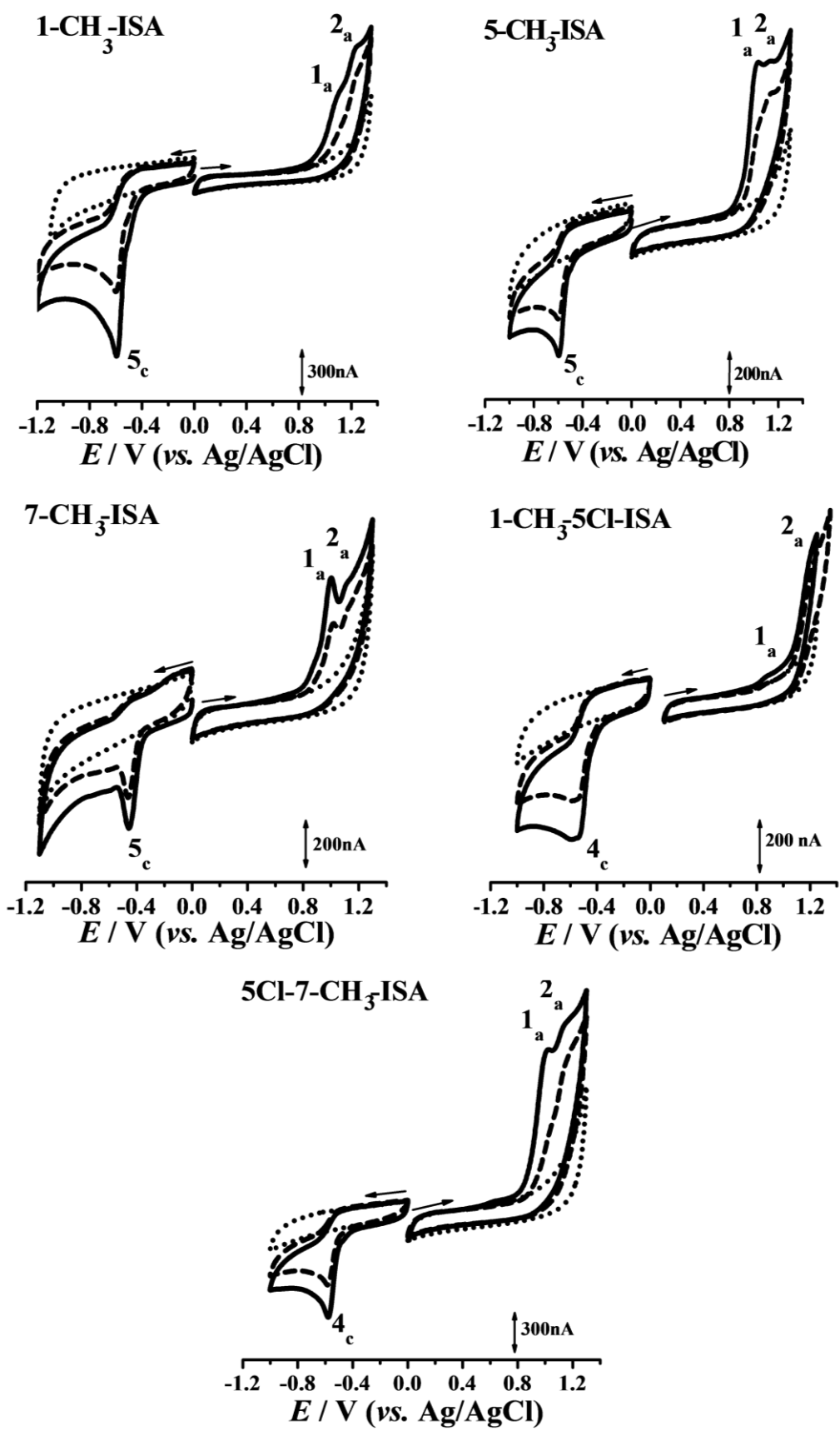


Figura 5.4 Voltamogramas cíclicos registados em (•••) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N_2 de derivados metil, (—) primeiro e (- - -) segundo varrimentos, $v = 100$ mV/s.

5.1 Oxidação eletroquímica

O estudo dos derivados substituídos com morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, foram divididos em três grupos: 1-morfolinometil; 1-hidroximetil, e 1,5, ou 7-metil e as suas formas halogenadas. Os mecanismos de oxidação foram investigados em soluções preparadas em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0.1 M), por voltametria cíclica, de DP e de SW, no intervalo de potencial entre 0,0 V e + 1,3 V.

5.1.1 Derivados 1-morfolinometil-ISA

5.1.1.1 Voltametria cíclica

O grupo dos derivados 1-morfolinometil-ISA é constituído pelos derivados que possuem o substituinte 1-CH₂MPO na posição C1 da ISA, e pelas suas formas halogenadas, com átomos de F, Br e I.

Os voltamogramas cíclicos efetuados em soluções de 500 µM ISA, 175 µM 1-CH₂MPO-5I-ISA, 500 µM 1-CH₂MPO-5Br-ISA, 340 µM 1-CH₂MPO-5F-ISA, apresentaram, para todos os compostos analisados, dois picos de oxidação irreversível, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,10$ V e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,20$ V **Figura 5.5(A-D)** e **Tabela 5.1**.

Ao realizar o segundo varrimento sem limpar a superfície do eletrodo, verificou-se uma diminuição na intensidade da corrente para os dois picos de oxidação, devido à adsorção dos produtos de oxidação na superfície do GCE, que diminuíram a área disponível para a oxidação, **Figura 5.5(A-D)**.

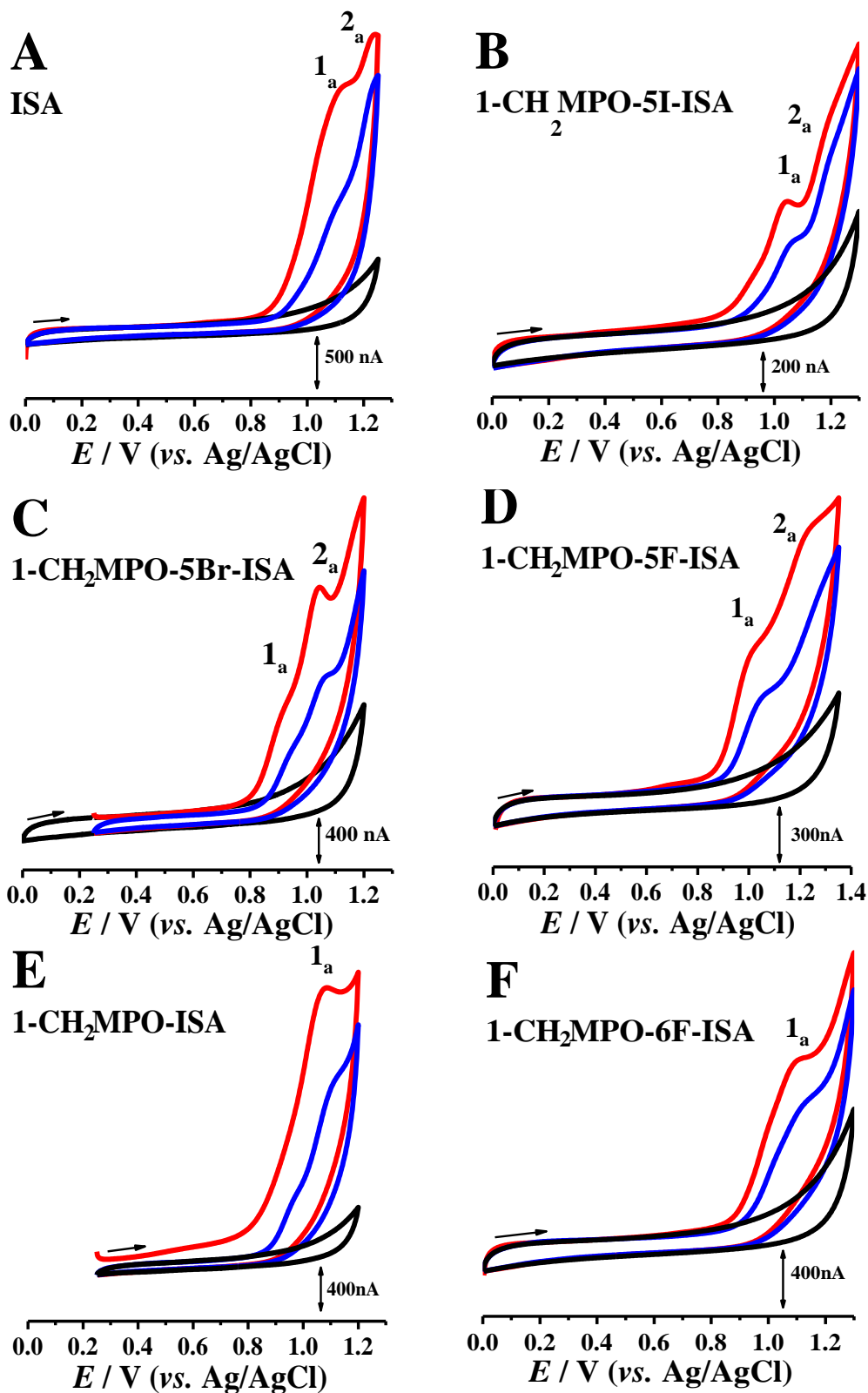


Figura 5.5 Voltamogramas cíclicos da oxidação em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de: (A) 500 μM ISA, (B) 175 μM 1-CH₂MPO-5I-ISA, (C) 500 μM 1-CH₂MPO-5Br-ISA (D) 340 μM 1-CH₂MPO-5F-ISA, (E) 500 μM 1-CH₂MPO-ISA e (F) 190 μM 1-CH₂MPO-6F-ISA (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 5.1 Potenciais de oxidação da ISA e dos derivados da ISA com morfolino, hidroximetil e metil e as suas formas halogenadas, obtidos por voltametria cíclica a pH = 7,0.

Derivados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)
ISA	$E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-ISA	$E_{p1a} = + 1,08 \text{ V}$ —
1-CH ₂ MPO-5I-ISA	$E_{p1a} = + 1,05 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,19 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-5F-ISA	$E_{p1a} = + 1,00 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,22 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-5Br-ISA	$E_{p1a} = + 0,90 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,05 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-6F-ISA	$E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$ —
1-CH ₂ OH-ISA	$E_{p1a} = + 1,09 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$
1-CH ₂ OH-5Br-ISA	$E_{p1a} = + 1,06 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,19 \text{ V}$
3-OH-ISA	$E_{p1a} = + 1,04 \text{ V}$ —
1-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1,09 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,23 \text{ V}$
1-CH ₃ -5Cl-ISA	$E_{p1a} = + 0,86 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,20 \text{ V}$
5-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1,04 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,13 \text{ V}$
7-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1,01 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,13 \text{ V}$
5Cl-7CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1,00 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1,11 \text{ V}$

Os voltamogramas cíclicos efetuados em 500 μM 1-CH₂MPO-ISA, **Figura 5.5E** e 190 μM 1-CH₂MPO-6F-ISA, **Figura 5.5F**, apresentaram apenas um pico de oxidação irreversível, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,08 \text{ V}$.

A influência da velocidade de varrimento na oxidação do derivado 1-CH₂MPO-ISA foi investigada numa solução de 500 μM 1-CH₂MPO-ISA, com velocidades a variar entre 5 e 100 mV s^{-1} [245]. Depois de cada medida, a superfície do eletrodo foi polida para evitar possíveis problemas de adsorção dos produtos de oxidação no GCE. Aumentando a velocidade de varrimento, a corrente de pico aumenta linearmente com \sqrt{v} , comportamento característico de um processo de oxidação controlado por difusão [245]. De facto, o morfolino em meio fisiológico tem um caráter altamente hidrofílico [279], que faz com que o grupo 1-CH₂MPO, ligado na posição C1 do anel benzénico da ISA, altere as características hidrofóbicas da ISA para hidrofílicas [91,92].

5.1.1.2 Voltametria de impulso diferencial

Os voltamogramas de DP sucessivos efetuados numa solução de 20 μM de 1-CH₂MPO-ISA, **Figura 5.6**, mostraram a ocorrência de um único pico de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,08 \text{ V}$, o que está de acordo com os resultados da voltametria cíclica da 1-CH₂MPO-ISA, **Figura 5.5E**. O segundo pico de oxidação, pico 2a, ocorre para potenciais muito mais elevados, próximo do potencial correspondente à evolução do oxigénio, não sendo detetável por voltametria cíclica e de DP, no intervalo de potencial do GCE, até + 1,3 V.

No segundo varrimento de DP da 1-CH₂MPO-ISA foram detetados dois novos picos de oxidação, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,32 \text{ V}$, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,56 \text{ V}$. Em varrimentos sucessivos, sem limpar a superfície do eletrodo, a corrente dos picos 3a e 4a aumentou, **Figura 5.6**, uma vez que continua a ocorrer a oxidação das moléculas.

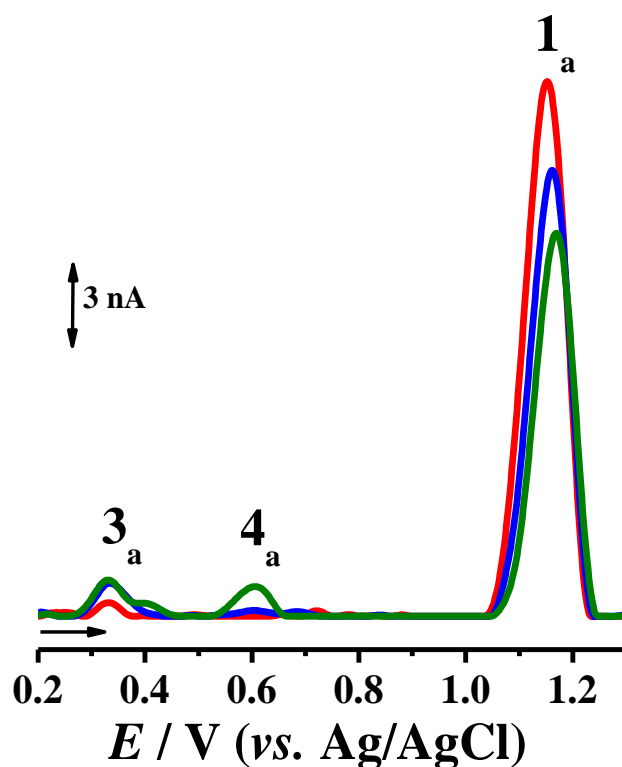


Figura 5.6. Voltamogramas de DP sucessivos, com correção de linha de base, numa solução de 20 μM 1-CH₂MPO-ISA, em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M); (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $v = 5 \text{ mV/s}$.

Os picos 3a e 4a correspondem à oxidação dos produtos de oxidação que se formam no pico 1a do derivado 1-CH₂MPO-ISA. Este processo de oxidação é muito semelhante ao da oxidação da ISA, na superfície do GCE [91,92], que ocorre em várias etapas sucessivas no anel benzénico.

5.1.1.3 Voltametria de onda quadrada

As experiências de voltametria de SW, efetuadas numa solução de 100 μM 1-CH₂MPO-ISA, com uma velocidade efetiva de $v_{\text{eff}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$, **Figura 5.7A e B**, revelaram, no primeiro varrimento, um pico de oxidação irreversível, pico 1a, a $E_{\text{p1a}} = + 1,20 \text{ V}$, confirmado pelas componentes direta e inversa da corrente total, **Figura 5.7A**.

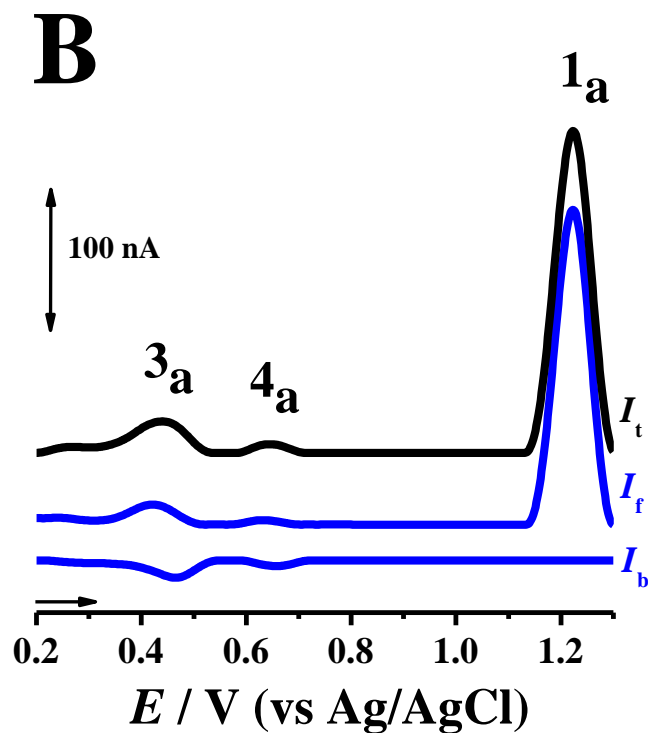
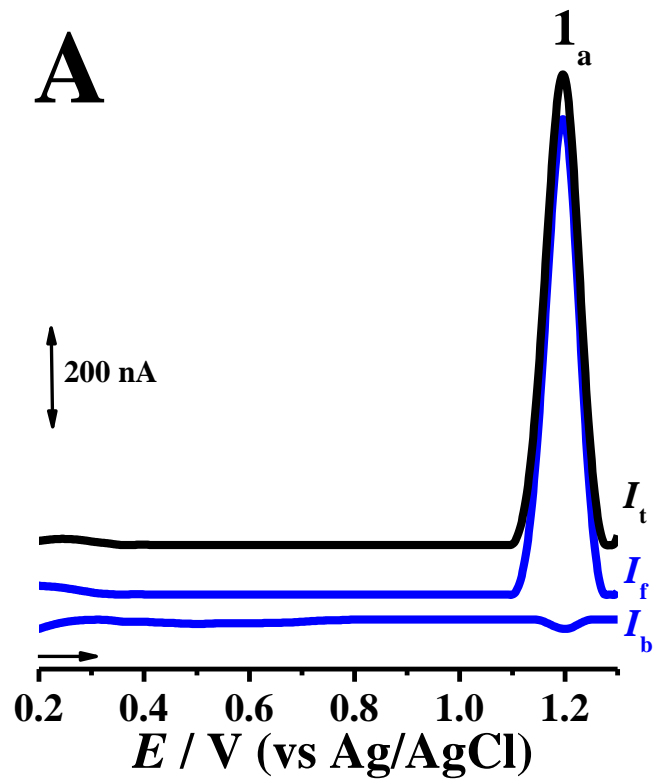


Figura 5.7 Voltamogramas de SW, com correção da linha de base, em solução de $100 \mu\text{M}$ 1- $\text{CH}_2\text{MPO-ISA}$ em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M); (A) primeiro e (B) sexto varrimentos; $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, amplitude de pulso 50 mV , $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (—) I_t – corrente total, (—) I_f – corrente direta, (—) I_b – corrente inversa.

Nos varrimentos seguintes, efetuados sem limpar o GCE, foram observados dois picos de oxidação reversíveis, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,33$ V, e pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,60$ V, que correspondem à oxidação reversível dos produtos de oxidação da 1-CH₂MPO-ISA, cuja corrente aumenta com o aumento do número de varrimentos efetuados, **Figura 5.7B**.

A oxidação dos derivados substituídos com 1-CH₂MPO na posição C1 e os seus derivados com átomos de halogéneo nas posições C5 (I, F e Br) ou C6 (F) é semelhante à oxidação da ISA, na superfície do GCE, **Tabela 5.1** [91,92].

Apesar das características do anel morfolino alterarem o caráter hidrofóbico da ISA, a sua presença na estrutura da ISA não alterou significativamente os potenciais de oxidação dos derivados, à exceção da 1-CH₂MPO-5-Br-ISA, que é oxidada para potenciais mais baixos, devido ao efeito provocado pelo átomo de bromo ligado na posição C5 do anel benzénico.

5.1.1.4 Mecanismo de oxidação

O mecanismo de oxidação dos derivados da ISA com 1-CH₂MPO foi proposto, **Figura 5.8**, tendo em consideração os resultados de voltametria cíclica, de DP e de SW obtidos para estes derivados, e estabelecendo uma comparação com os processos de oxidação da ISA, dos derivados nitrogenados [92] e halogenados [91] (*Capítulos 3 e 4*), e dos compostos fenólicos [105,276].

O processo de oxidação dos derivados substituídos com 1-CH₂MPO ou os seus derivados halogenados na posição C5 ou C6, ocorre em passos sucessivos no anel benzénico. No primeiro passo da oxidação foi removido um eletrão do anel benzeno, que corresponde ao pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,20$ V, que depois sofre uma desprotonação e um ataque nucleofílico pela água, formando-se um derivado hidróxilo.

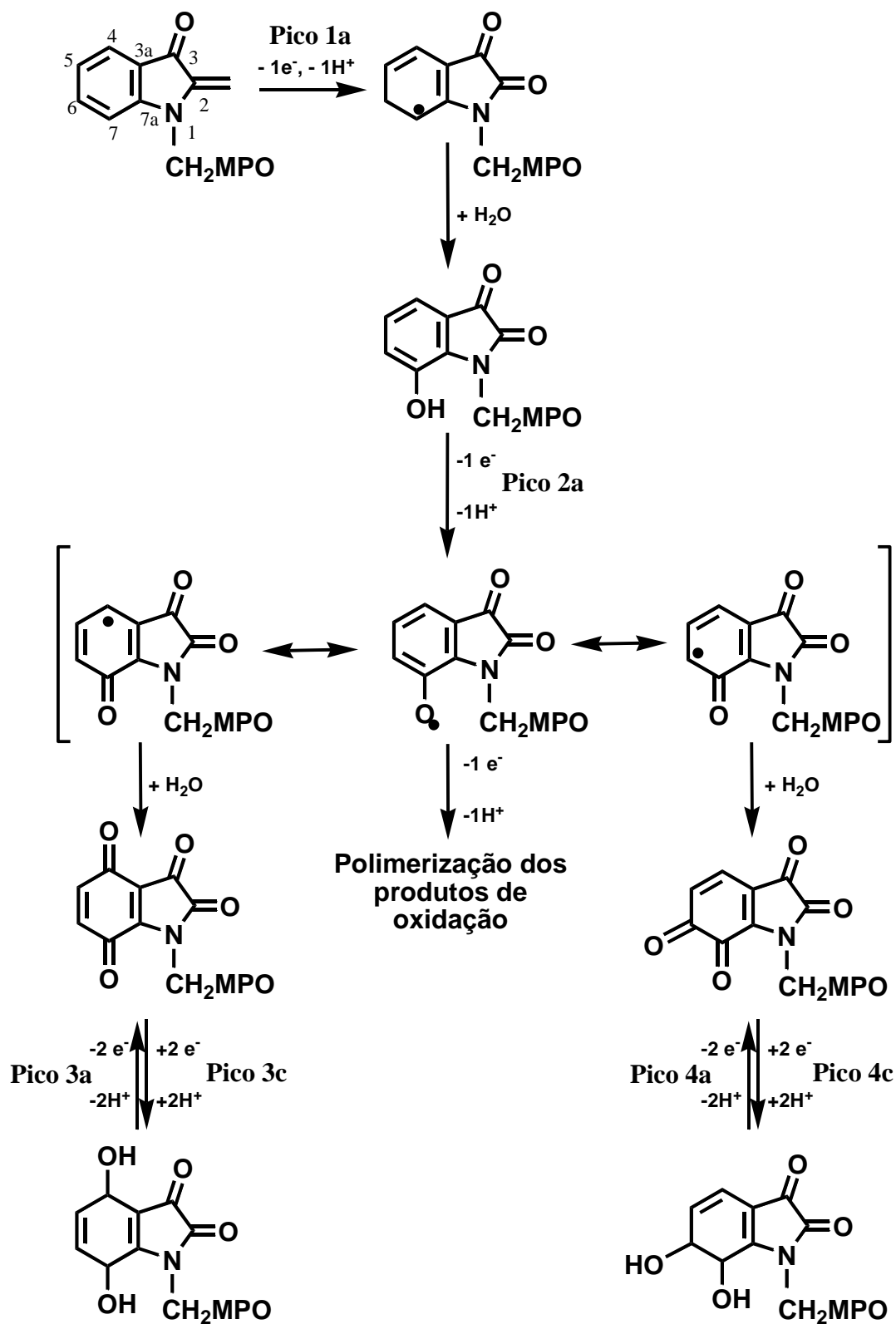


Figura 5.8 Esquema do mecanismo de oxidação proposto para os derivados 1-morfolinometil (1-CH₂MPO).

O passo seguinte, o pico 2a, corresponde à oxidação do grupo OH do derivado hidróxilo, formado na primeira transferência eletrônica **Figura 5.8**. Os produtos eletroativos da oxidação reversível do grupo OH, gerado no segundo passo de oxidação pico 2a, são de seguida oxidados a potenciais de oxidação mais baixos, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,33$ V, levando à formação de *para*-quinona, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,60$ V, levando à formação de *orto*-quinona, **Figura 5.7**. A oxidação dos grupos OH também induz a formação de produtos poliméricos que adsorvem fortemente na superfície do GCE, no entanto, estes produtos ocorrem para potenciais mais positivos, não sendo possível a sua deteção, **Figura 5.7**.

5.1.2 Derivados 1-hidroximetil-ISA

5.1.2.1 Voltametria cíclica

A influência dos substituintes -OH e -CH₂OH na ISA foi investigada por voltametria cíclica, realizada na superfície do GCE, em soluções de 1-CH₂OH-ISA, 1-CH₂OH-5-Br-ISA e 3-OH-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 5.9**. Os resultados obtidos foram comparados com o processo de oxidação da ISA, **Tabela 5.1**.

Os voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos em soluções 230 μM de 1-CH₂OH-ISA e 260 μM de 1-CH₂OH-5-Br-ISA mostraram, no primeiro varrimento, a ocorrência de dois picos de oxidação irreversíveis, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,08$ V e pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,20$ V, e na direção negativa do varrimento não foram observados picos de redução. No segundo varrimento, a corrente dos picos diminuiu consideravelmente, devido à adsorção dos produtos de oxidação na superfície do GCE, **Figura 5.9A e B**.

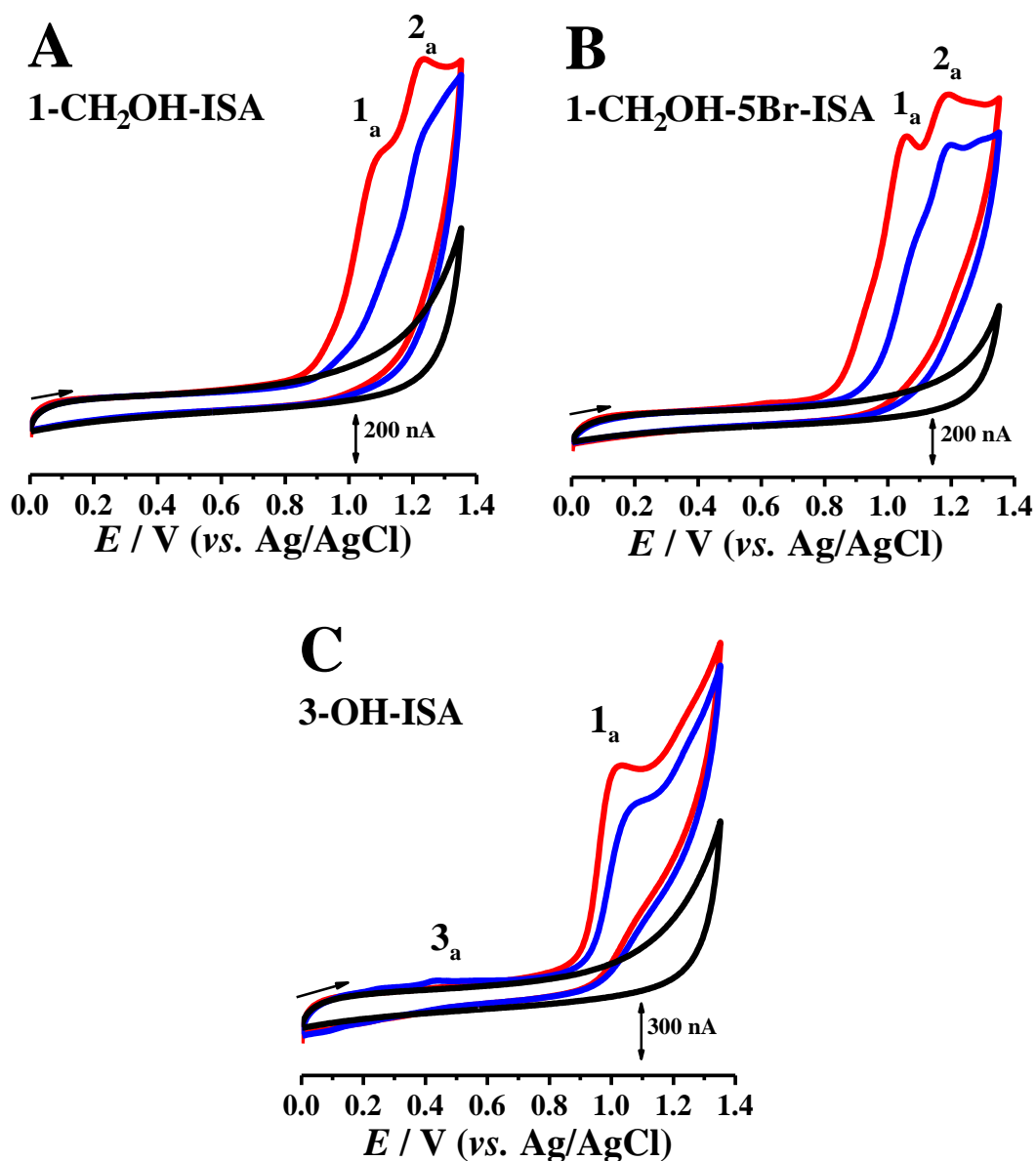


Figura 5.9 Voltamogramas cíclicos da oxidação em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), em soluções saturadas de N₂, de: (A) 230 μM 1-CH₂OH-ISA, (B) 260 μM 1-CH₂OH-5-Br-ISA e (C) 300 μM 3-OH-ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No primeiro varrimento de voltametria cíclica obtido numa solução de 300 μM de 3-OH-ISA, observou-se a ocorrência de um pico de oxidação irreversível, o pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,02 \text{ V}$, **Figura 5.9C**. Nos varrimentos seguintes foi detetado um novo pico de oxidação, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,44 \text{ V}$, que está relacionado com a oxidação dos produtos de oxidação da 3-OH-ISA formados no pico 1a.

5.1.2.1 Voltametria de impulso diferencial

Voltamogramas de DP sucessivos foram realizados numa solução de 20 μM de 1- $\text{CH}_2\text{OH-ISA}$, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M),

Figura 5.10.

No primeiro voltamograma de DP, registaram-se dois picos de oxidação, pico 1a a $E_{p1a} = + 1,10$ V, que foi também observado por voltametria cíclica, seguido por um novo pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,26$ V. No segundo voltamograma de DP sucessivo, sem limpar a superfície do GCE, foram detetados dois novos picos de oxidação, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,30$ V, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,56$ V. Aumentando o número de varrimentos sucessivos, verificou-se um aumento da corrente dos picos, 3a e 4a, **Figura 5.10.**

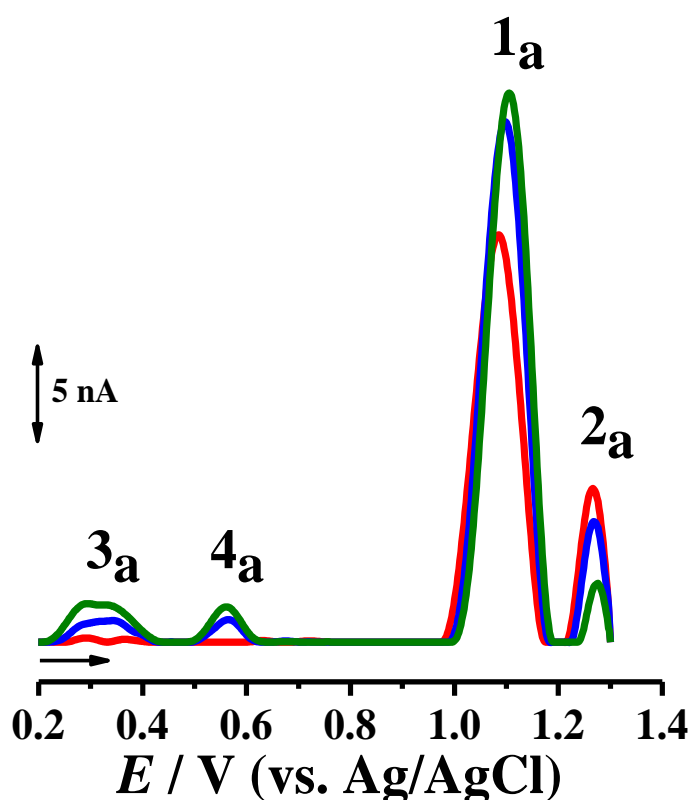


Figura 5.10 Voltamogramas de DP sucessivos, com correção de linha de base, numa solução de 20 μM de 1- $\text{CH}_2\text{OH-ISA}$, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0,1 M), (—) primeiro, (—) segundo e (—) terceiro varrimentos. $\nu = 5$ mV/s.

Os resultados obtidos para os derivados da ISA substituídos com 1-CH₂OH, 1-CH₂OH-5-Br e 3-OH permitem concluir, através da comparação com a ISA, que estes grupos não provocaram alterações significativas no mecanismo de oxidação da ISA, seguindo o mesmo mecanismo de oxidação proposto para os derivados 1-morfolinometil, **Figura 5.8**.

5.1.3 Derivados metil-ISA

5.1.3.1 Voltametria cíclica

A influência do grupo metilo -CH₃, ligado em diferentes posições na molécula de ISA, N1, C5 ou C7, na presença ou ausência do átomo Cl na posição C5, foi investigada por voltametria cíclica, em soluções de 1-CH₃-ISA, 1-CH₃-5-Cl-ISA e 5-CH₃-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), **Figura 5.11** e **Tabela 5.1**. Os resultados obtidos foram comparados com a oxidação da ISA.

Para todos os derivados metil da ISA, no primeiro varrimento de voltametria cíclica ocorreu a formação de dois picos de oxidação irreversíveis, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,00$ V, e o pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,10$ V, **Figura 5.11**. No entanto, no derivado 1-CH₃-5-Cl-ISA, a presença do átomo Cl na posição C5 do anel benzênico afetou significativamente o processo de oxidação, **Figura 5.11D**, verificando-se um desvio no potencial do pico 1a para valores mais negativos, e o pico 2a desloca-se no sentido dos potenciais mais positivos.

No segundo varrimento sucessivo, sem limpar o eletrodo, a corrente dos picos de oxidação diminuiu devido à adsorção dos produtos de oxidação dos derivados metil da ISA na superfície do GCE, **Figura 5.11**, diminuindo deste modo a área disponível na superfície do eletrodo e dificultando a oxidação das moléculas.

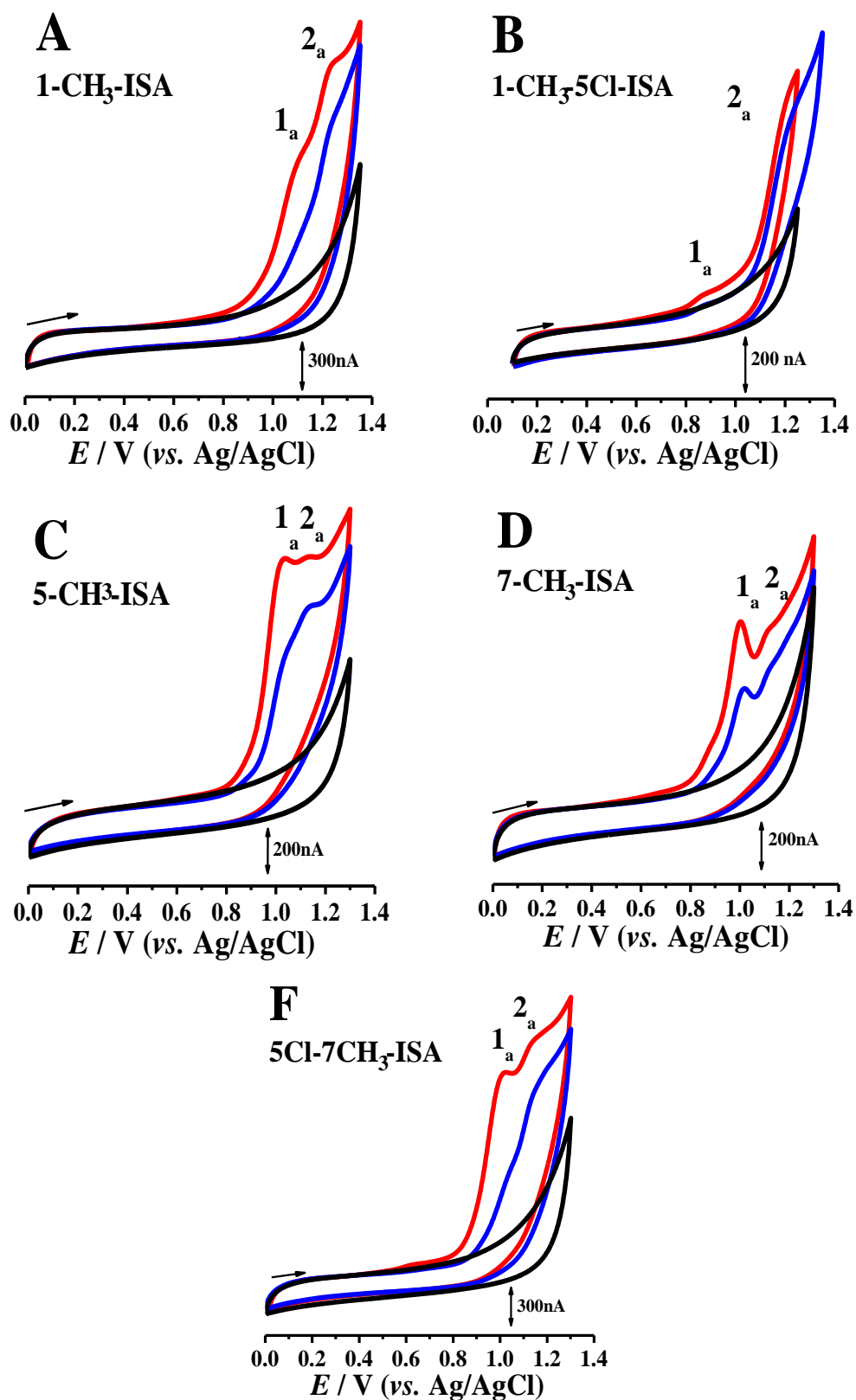


Figura 5.11 Voltamogramas cíclicos da oxidação em (—) electrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de: **(A)** 500 μM 1-CH₃-ISA, **(B)** 350 μM 1-CH₃-5-Cl-ISA **(C)** 190 μM 5-CH₃-ISA **(D)** 280 μM 7-CH₃-ISA e **(E)** 300 μM 5-Cl-7-CH₃-ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100$ mV/s.

5.1.3.2 Voltametria de impulso diferencial

Os voltamogramas de DP sucessivos, realizados numa solução de 50 μM de 1-CH₃-ISA revelaram, no primeiro varrimento, a ocorrência de dois picos de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,06 \text{ V}$ e pico 2a, $E_{p2a} = + 1,24 \text{ V}$, **Figura 5.12**.

No segundo voltamograma de DP, realizado nas mesmas condições e sem limpar a superfície do GCE, observaram-se dois novos picos de oxidação, que correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da 1-CH₃-ISA que ocorre no anel benzénico, com a formação dos derivados *para*-quinona da ISA, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,35 \text{ V}$, e *orto*-quinona da ISA, pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,58 \text{ V}$. Uma vez que a oxidação do derivado 1-CH₃-ISA continua a ocorrer nos varrimentos seguintes, os seus produtos de oxidação continuam a formar-se e, conseqüentemente, a corrente de ambos os picos de oxidação, 3a e 4a, aumenta, **Figura 5.12**. A corrente dos picos 1a e 2a diminui, devido a adsorção do derivado 1-CH₃-ISA na superfície de GCE.

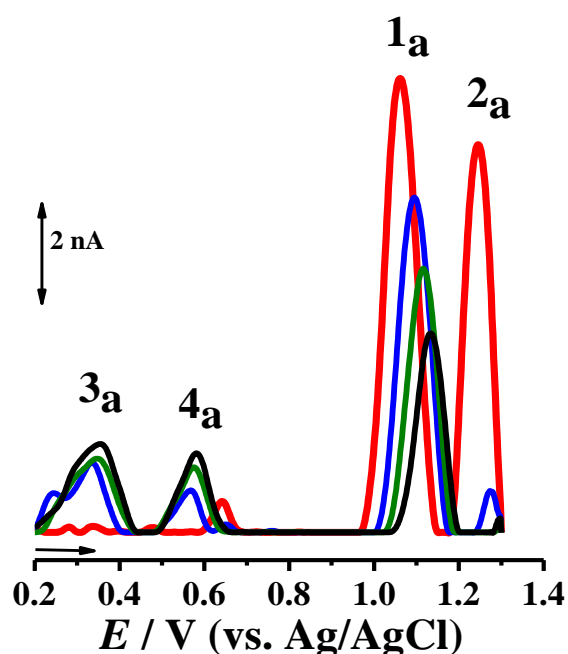


Figura 5.12 Voltamogramas de DP sucessivos, com correção de linha de base, numa solução de 50 μM de 1-CH₃-ISA, em eletrólito inerte a pH = 7,2 (tampão fosfato 0,1 M), (—) primeiro, (—) segundo, (—) terceiro e (—) quarto varrimentos. $v = 5 \text{ mV/s}$.

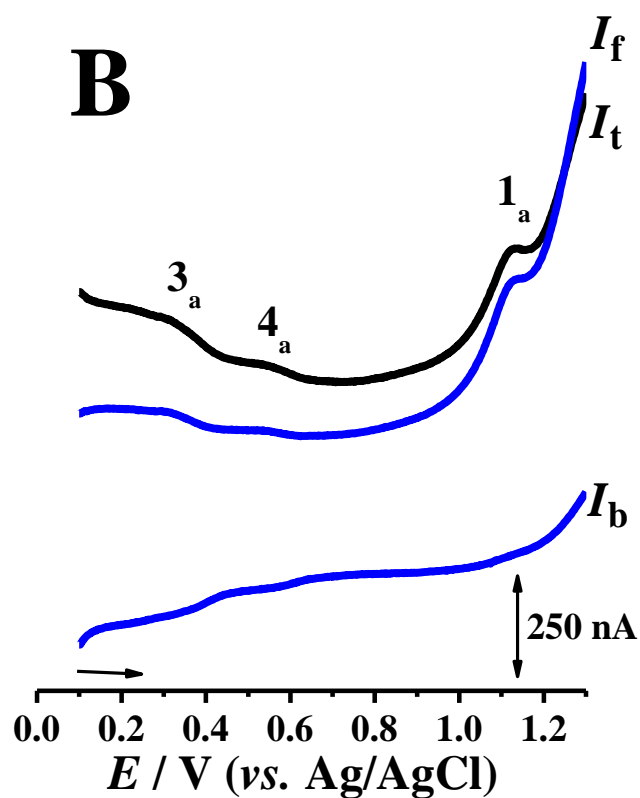
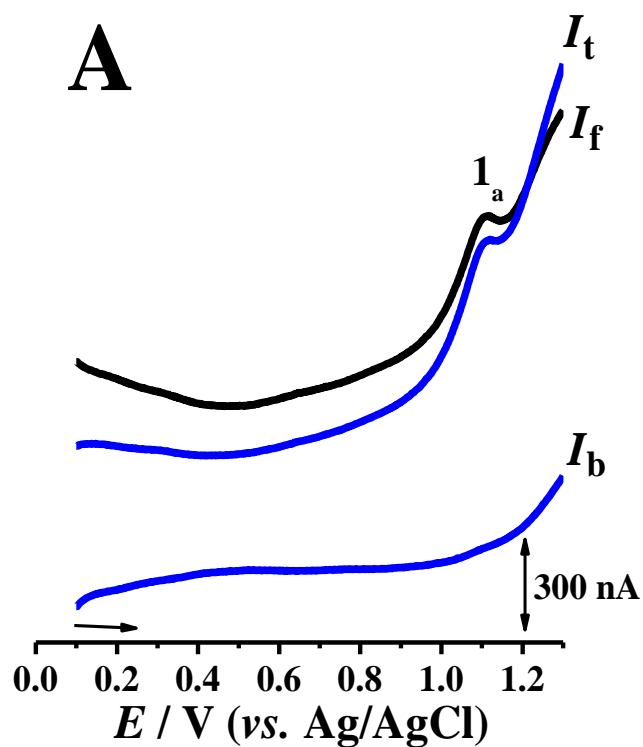


Figura 5.13 Voltamogramas de SW, em solução de 100 μM 1- CH_3 -ISA em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M); (A) primeiro e (B) quarto varrimentos; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2\text{mV}$, amplitude de pulso 50 mV, $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (—) I_t – corrente total, (—) I_f – corrente direta, (—) I_b – corrente inversa.

5.1.3.3 Voltametria de onda quadrada

As experiências de voltametria de SW foram realizadas em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão fosfato 0.1 M), em soluções de $100 \mu\text{M}$ 1- CH_3 -ISA, **Figura 5.13**.

No primeiro voltamograma de SW observaram-se os dois picos de oxidação, pico 1a, a $E_{p1a} = + 1,10 \text{ V}$, e pico 2a, a $E_{p2a} = + 1,25 \text{ V}$. No varrimento seguinte, os picos reversíveis, pico 3a, a $E_{p3a} = + 0,34 \text{ V}$, e o pico 4a, a $E_{p4a} = + 0,55 \text{ V}$ foram detetados, e os resultados estão de acordo com a voltametria de DP, **Figura 5.10**.

As técnicas de voltametria cíclica, de DP e de SW revelaram um mecanismo de oxidação idêntico para os derivados 1- CH_3 -ISA, 1- CH_3 -5-Cl-ISA e 5- CH_3 -ISA analisados, que ocorre em passos sucessivos no anel benzênico, **Figura 5.8**. O grupo metilo não afetou os potenciais de oxidação da ISA, no entanto, foram detetadas pequenas diferenças em todos os processos de oxidação, demonstrando uma maior ou menor interação entre os diferentes derivados da ISA, com o grupo substituinte metilo, e a superfície do GCE. Esta interação está relacionada com o maior ou menor caráter hidrofílico e hidrofóbico originado pelos grupos substituintes na ISA.

5.2 Redução eletroquímica

Os mecanismos de redução de todos os derivados da ISA substituídos com morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, foram estudados por voltametria cíclica, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,2$ (tampão fosfato 0,1 M), no intervalo de potencial entre 0,0 V e - 1,2 V, na superfície do GCE. Durante as medidas foi mantido sempre um fluxo constante de N_2 , **Figuras 5.14, 5.15 e 5.16 e Tabela 5.2**.

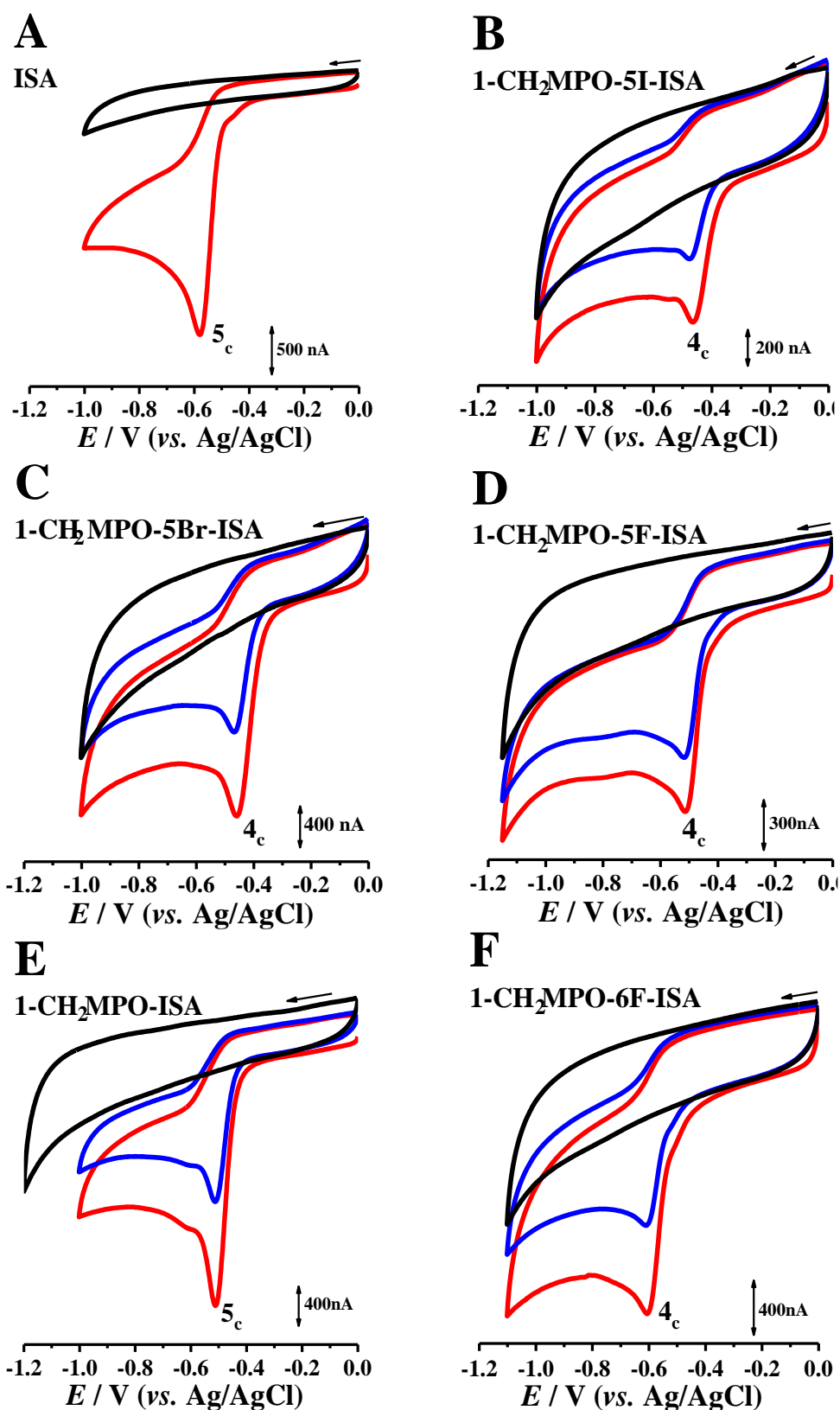


Figura 5.14 Voltamogramas cíclicos da redução em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de: **(A)** 500 μM ISA, **(B)** 175 μM 1-CH₂MPO-5-I-ISA, **(C)** 500 μM 1-CH₂MPO-5-Br-ISA, **(D)** 340 μM 1-CH₂MP-5-F-ISA; **(E)** 500 μM 1-CH₂MPO-ISA e **(F)** 190 μM 1-CH₂MPO-6-F-ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

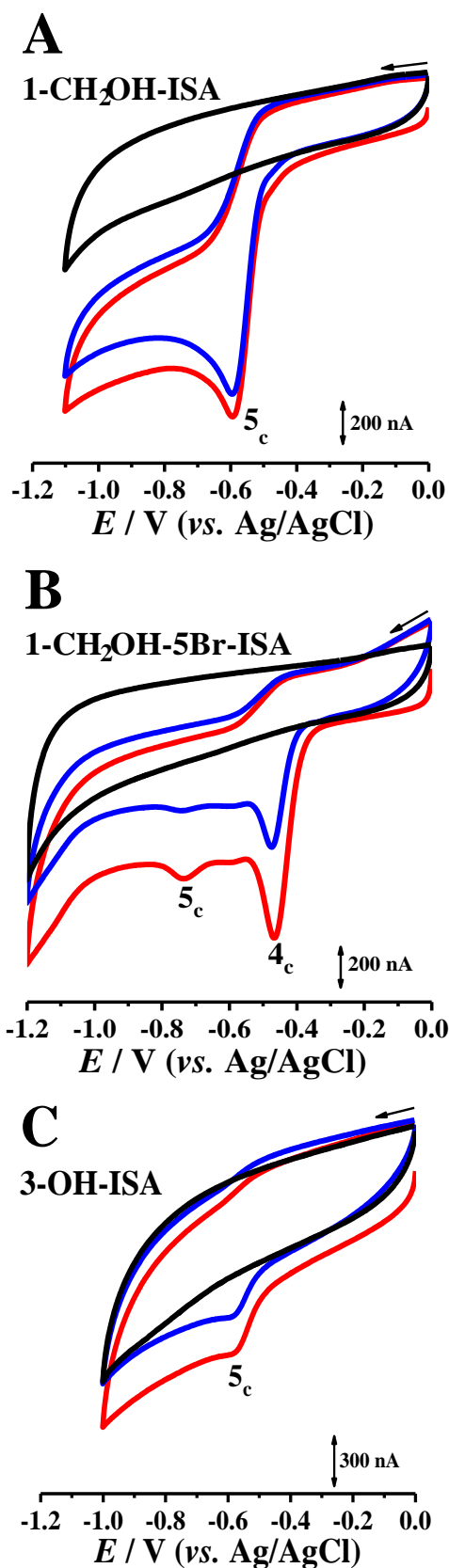


Figura 5.15 Voltamogramas cíclicos da redução em (—) eletrólito inerte a pH = 7,2 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de: (A) 230 μM 1-CH₂OH-ISA, (B) 260 μM 1-CH₂OH-5-Br-ISA (C) 300 μM 3-OH-ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

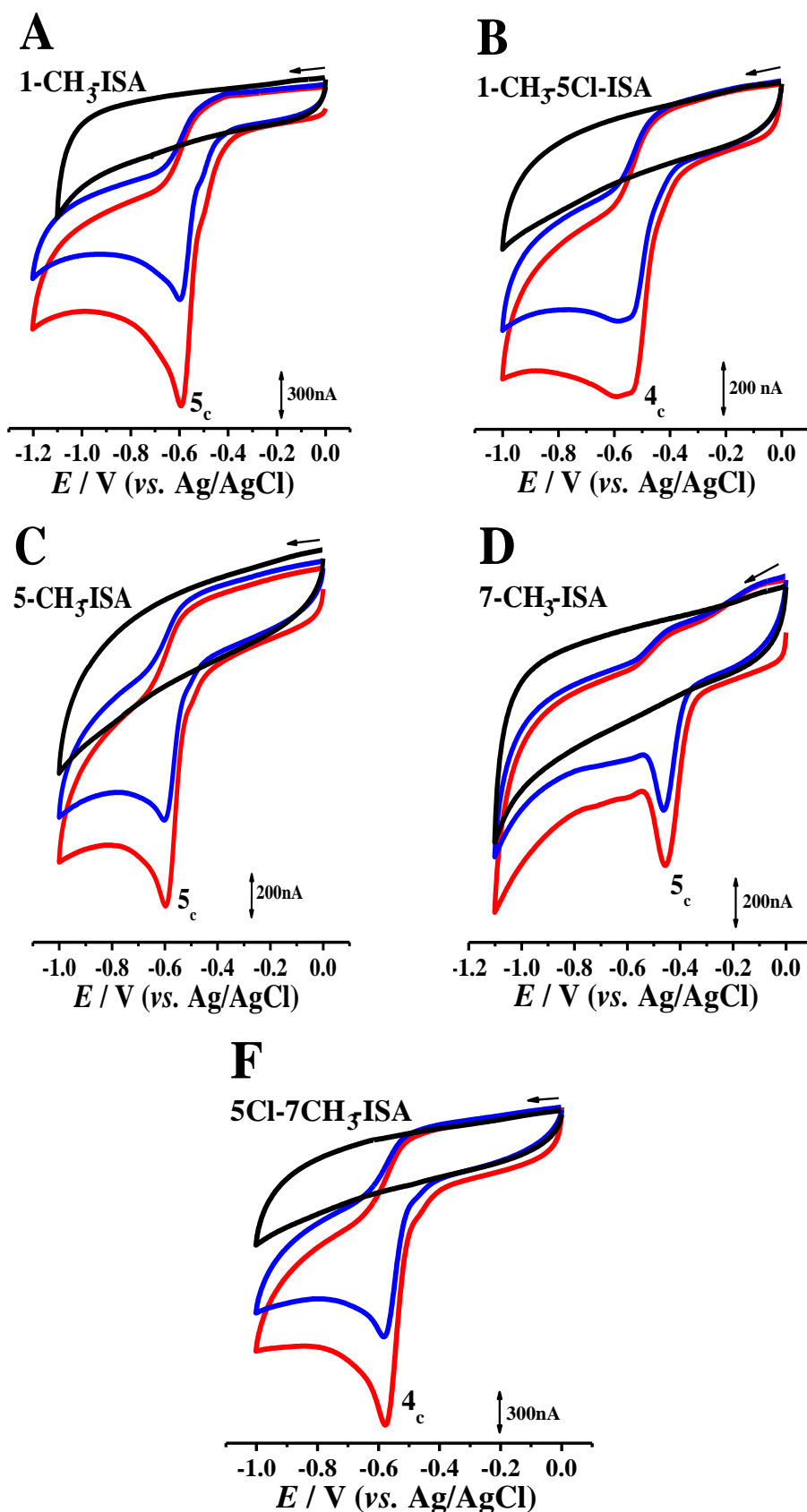


Figura 5.16 Voltamogramas cíclicos da redução registados em (—) eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), e em soluções saturadas de N₂ de: (A) 500 μM 1-CH₃-ISA, (B) 350 μM 1-CH₃-5-Cl-ISA (C) 190 μM 5-CH₃-ISA (D) 280 μM 7-CH₃-ISA e (E) 300 μM 5-Cl-7-CH₃-ISA, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100$ mV/s.

Tabela 5.2 Potenciais de redução da ISA e de derivados da ISA com morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, obtidos por voltametria cíclica a pH = 7,0.

Derivados da ISA	Potencial / V (vs. Ag/AgCl)
ISA	$E_{p5c} = - 0,58$ V
1-CH ₂ MPO-ISA	$E_{p5c} = - 0,51$ V —
1-CH ₂ MPO-5I-ISA	$E_{p4c} = - 0,46$ V —
1-CH ₂ MPO-5Br-ISA	$E_{p4c} = - 0,45$ V —
1-CH ₂ MPO-5F-ISA	$E_{p4c} = - 0,51$ V —
1-CH ₂ MPO-6F-ISA	$E_{p4c} = - 0,59$ V —
1-CH ₂ OH-ISA	$E_{p5c} = - 0,59$ V —
1-CH ₂ OH-5Br-ISA	$E_{p4c} = - 0,46$ V $E_{p5c} = - 0,74$ V
3-OH-ISA	$E_{p5c} = - 0,57$ V —
1-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = - 0,59$ V —
1-CH ₃ -5Cl-ISA	$E_{p4c} = - 0,60$ V —
5-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = - 0,60$ V —
7-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = - 0,58$ V —
5Cl-7-CH ₃ -ISA	$E_{p4c} = - 0,46$ V —

Os derivados 1-CH₂MPO-ISA, **Figuras 5.14E**, 1-CH₂OH-ISA, **Figuras 5.15A**, 1-CH₃-ISA e 7-CH₃-ISA, **Figuras 5.16(A e D)** tal como a ISA, **Figuras 5.14A**, apresentaram um único passo de redução, o pico 5c, a $E_{p5c} \approx -0,60$ V, com um perfil voltamétrico muito semelhante, que corresponde à redução do grupo carbonilo, na posição C3 do anel pirrol [27,91,92].

Os derivados halogenados, 1-CH₂MPO-5-I-ISA, 1-CH₂MPO-5-F-ISA, 1-CH₂MPO-6-F-ISA, **Figura 5.14(B, C e D)**, 1-CH₂OH-5-Br-ISA, **Figura 5.15B**, 1-CH₃-5-Cl-ISA e 5-Cl-7-CH₃-ISA, **Figura 5.16(B e F)** mostraram, no primeiro varrimento de voltametria cíclica, um pico de redução irreversível, o pico 4c, a $E_{p4c} \approx -0,50$ V **Tabela 5.2**. No segundo varrimento, a corrente do pico de redução 4c diminuiu devido à adsorção na superfície do GCE dos produtos da redução dos derivados da ISA, que diminuem a área disponível para ocorrer redução. Considerando os potenciais deste processo catódico, e os resultados de voltametria cíclica para os derivados halogenados, conclui-se que o pico de redução 4c corresponde à transferência eletrônica para o sistema quinóide, seguido da transferência eletrônica para o átomo de halogéneo e a clivagem da ligação carbono-halogéneo, nas posições C5, C6 ou C7 [91].

Relativamente ao derivado 3-OH-ISA, no processo de redução verifica-se a formação de um pico catódico muito pequeno, pico 5c, a $E_{p5c} \approx -0,57$ V **Figura 5.15C**. A corrente do pico de redução 5c é muito pequena, quando comparado com os outros derivados da ISA estudados, isto ocorre porque a posição C3 da ISA já se encontra reduzida quimicamente e não existe nenhum átomo de halogéneo ligado ao anel benzénico.

5.3 Conclusões

Os mecanismos redox dos derivados da ISA substituídos com os grupos morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, com átomos de halogéneo, Cl, F, Br e I, na posição C5 do anel benzeno, foram estudados por voltametria cíclica, de DP e de SW, em eletrólito inerte a pH = 7,0, na superfície do GCE.

Os grupos funcionais morfolino, hidroximetil e metil não apresentam comportamento eletroquímico no GCE e, não afetaram significativamente os mecanismos redox da ISA. No entanto, nos derivados com átomos de halogéneo substituídos, o pico catódico está relacionado com a redução da ligação carbono-halogéneo.

No geral, observaram-se pequenas diferenças nos potenciais dos picos de oxidação e redução, que estão relacionadas com as características da interação dos derivados da ISA substituídas com morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, na superfície do GCE.

SEGUNDA PARTE

OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS PROTEINAS: CALMODULINA E CAVEOLINAS

CAPÍTULO 6

**Estudo Eletroquímico da Oxidação e das
Alterações Conformacionais da Calmodulina
Induzidas pelo Cálcio**

A calmodulina (CaM) é uma pequena proteína de ~ 16 kDa, presente em todas as células eucarióticas. A sua estrutura primária é formada por uma sequência de 148 aminoácidos. A sua estrutura secundária apresenta 8 α -hélices constituídas por 50 resíduos de aminoácidos (56%) e 4 folhas β , constituídas por 10 resíduos de aminoácidos (23%), **Figura 6.1**.

A CaM é uma das proteínas mais importantes de sinalização do cálcio. É responsável pela regulação de numerosas reações mediadas pelo cálcio e, conseqüentemente tem um papel fundamental no controlo de vários processos fisiológicos. Existe na forma livre sem cálcio ApoCalmodulina (ApoCaM) e na forma saturada de cálcio HoloCalmodulina (HoloCaM), **Figura 6.2**.

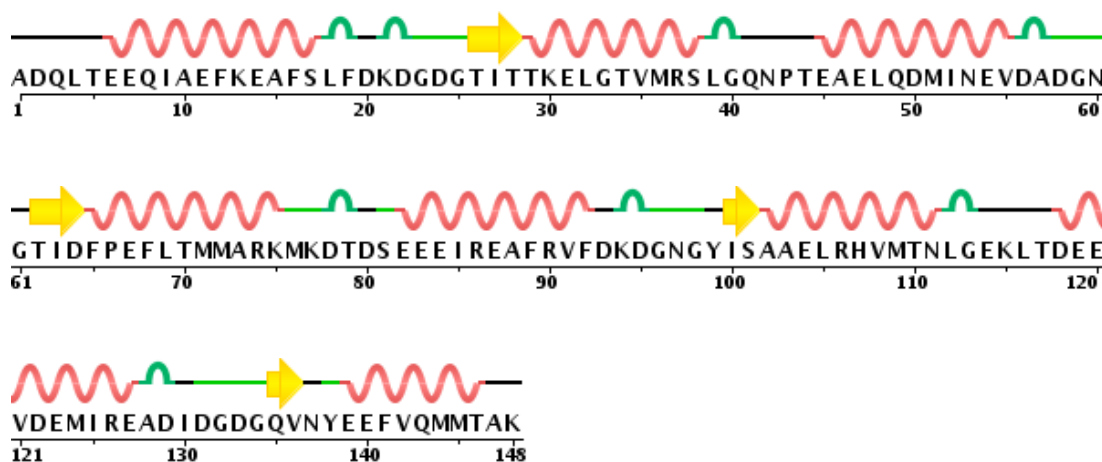


Figura 6.1 Estruturas primária e secundária da calmodulina (CaM)
[PDB, ficheiro 1CFD, UniProtKB (P62155)][114]

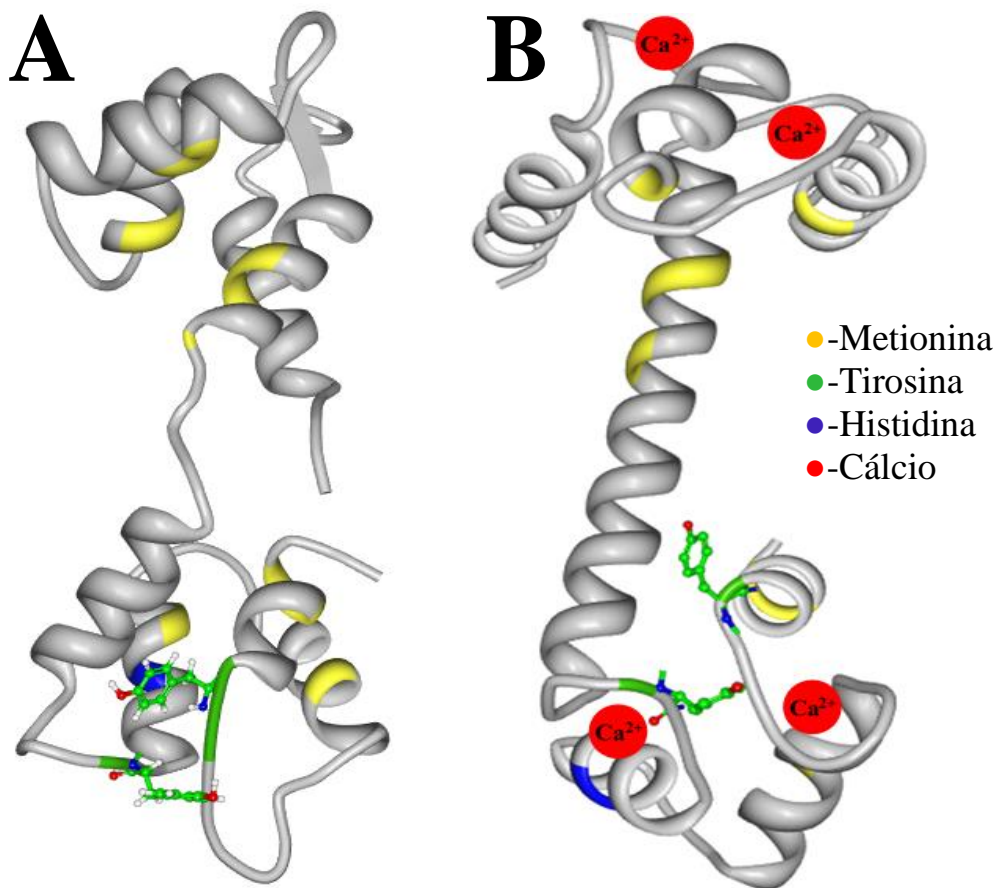


Figura 6.2 Estrutura terciária da (A) ApoCaM e da (B) HoloCaM [modificada a partir do PDB, ficheiro 1CFD e 1CLL, respetivamente)][114]

A análise da estrutura primária da CaM mostra que, dos 148 resíduos de aminoácidos, apenas 13 apresentam propriedades eletroquímicas: 10 resíduos de metionina (Met), 2 resíduos de tirosina (Tyr) e 1 resíduo de histidina (His),

Figura 6.2. Estes aminoácidos eletroativos estão distribuídos aleatoriamente pelos dois domínios N- e C-terminal.

O objetivo deste estudo foi a investigação das alterações da conformação da CaM, provocadas pela presença de cálcio no meio. Um filme de CaM foi depositado na superfície do GCE e o seu comportamento eletroquímico foi avaliado por voltametria cíclica e de DP. Para desnaturar a estrutura tridimensional da CaM, foram realizadas incubações com os agentes dodecil sulfato de sódio (SDS) e os agentes redutores

tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) e ditioneitol (DTT), e a ureia, para diferentes tempos de incubação.

A ligação do cálcio à CaM provoca alterações conformacionais na sua estrutura, portanto o comportamento eletroquímico da proteína também vai sofrer alterações, que foram avaliadas por voltametria de DP e por EIS, usando uma superfície do GCE, e através da análise gravimétrica com a QCM.

6.1 Oxidação da CaM no estado nativo. Efeito do pH

As experiências de voltametria de DP foram realizadas numa solução de 30 μM CaM em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7.0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M) e apresentaram um pico de oxidação pico P_{Tyr} , a $E_{\text{Tyr}} = + 0,66 \text{ V}$. O pico P_{Tyr} corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr⁹⁹ e Tyr¹³⁸ [105], **Figura 6.3**.

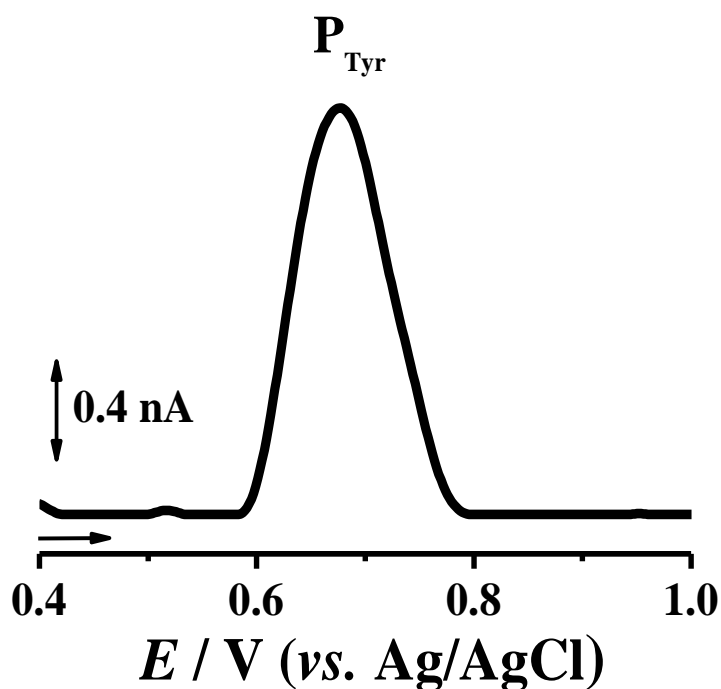


Figura 6.3 Voltamograma de DP, com correção da linha de base, numa solução de 30 μM CaM, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M). $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os picos relativos à oxidação dos resíduos de aminoácido Met, a $E_{\text{Met}}^1 = + 1,12$ V e $E_{\text{Met}}^2 = + 1,35$ V, e do resíduo do aminoácido His, a $E_{\text{His}} = + 1,15$ V [105,106,112], não foram observados, devido à estrutura tridimensional da CaM e à conformação adoptada pela proteína em solução, que dificultou o seu processo de oxidação.

A influência do pH na oxidação eletroquímica da CaM em estado nativo, foi estudada por voltametria de DP na superfície do GCE, numa ampla gama de eletrólitos inertes, que variou entre $2,0 < \text{pH} < 10,0$, **Tabela 2.3**. Os voltamogramas de DP em soluções de $30 \mu\text{M}$ de CaM, em diferentes eletrólitos de força iónica $0,1 \text{ M}$, mostraram apenas o pico da Tyr, P_{Tyr} , **Figura 6.4A**.

Devido à posição dos resíduos dos aminoácidos Met e His, na estrutura tridimensional da CaM, **Figura 6.2**, não foi possível observar os picos de oxidação destes resíduos de aminoácidos, que na superfície do GCE aparecem a potenciais, $E_{\text{Met}} = 1,25 \text{ V}$ e $E_{\text{His}} = 1,15 \text{ V}$ [106,112]. O resíduo His situa-se numa α -hélice e está rodeado por mais duas α -hélices, ou seja, encontra-se protegido da oxidação, neste caso, as correntes e velocidades de oxidação são mais baixas e por isso a sua deteção é mais difícil. O mesmo acontece com os resíduos de Met que se situam todos nas α -hélices, tornando mais difícil a oxidação das Met, que na superfície do GCE, ocorre a potenciais mais elevados.

O potencial do pico da Tyr, P_{Tyr} , foi dependente do pH, deslocando-se para valores menos positivos, com o aumento do pH, **Figura 6.4B**. O valor mais elevado da corrente do pico de oxidação P_{Tyr} ocorre para $\text{pH} \sim 6$ (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$). A inclinação da reta de 59 mV por unidade de pH, **Figura 6.4B**, e a largura a meia altura de $W_{1/2} \approx 100 \text{ mV}$ mostra que a reação de oxidação da CaM no estado nativo, para o pico P_{Tyr} ocorre com a transferência de um eletrão e um protão [105].

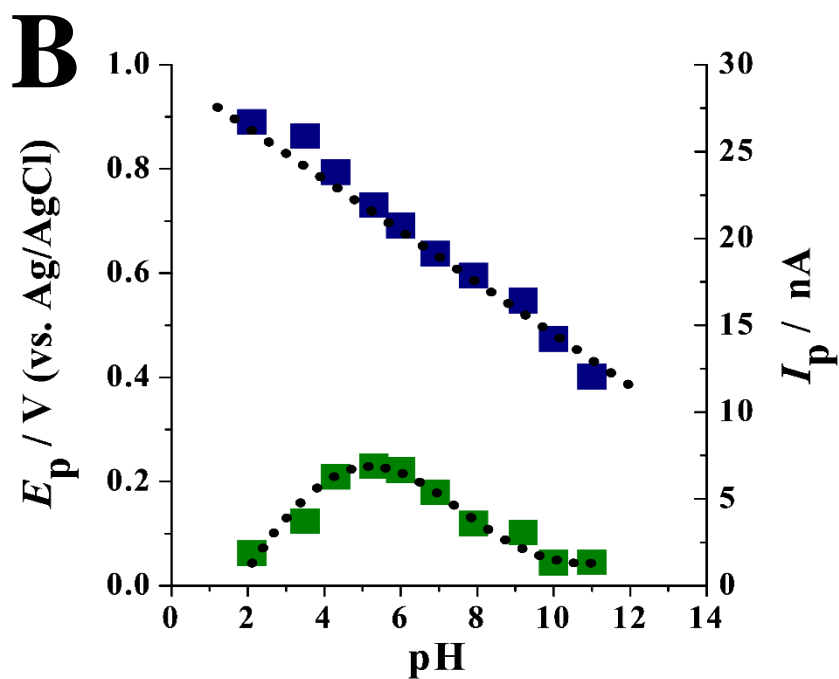
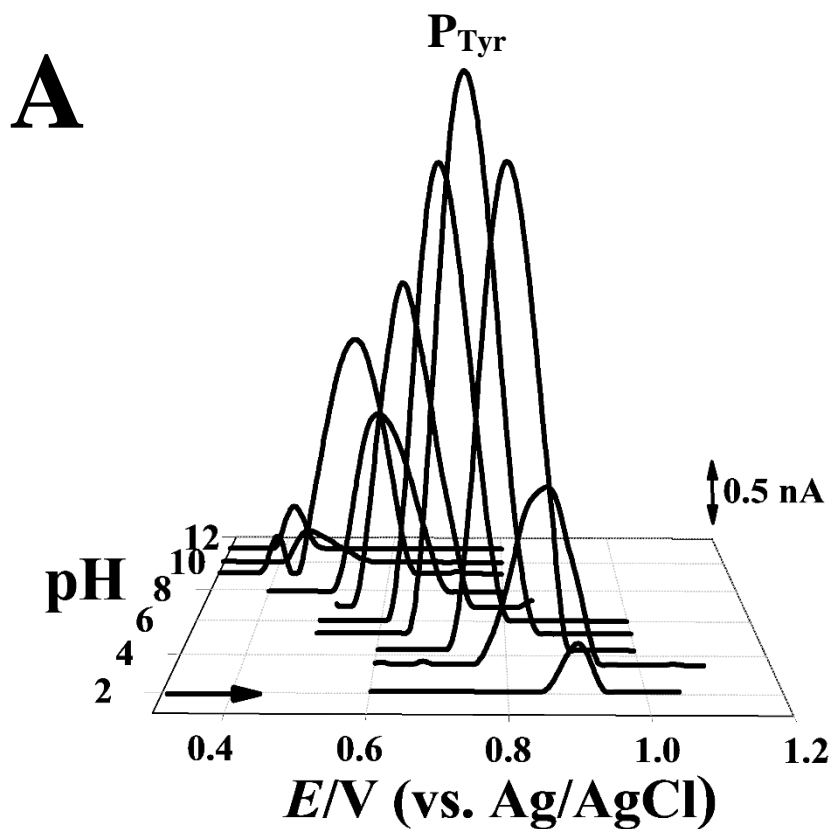


Figura 6.4 (A) Voltamogramas de DP em 3D, com linha de base corrigida, em soluções de $30 \mu\text{M}$ CaM, em função do pH; (B) Gráfico da variação de E_p e I_p do pico P_{Tyr} vs. pH. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

6.2 Caracterização do filme multicamada de CaM no GCE por CV e EIS

A técnica de EIS permite obter informações detalhadas dos processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução. A EIS permite monitorizar a caracterização interfacial das superfícies de eletrodo [252,280,281].

As medidas de EIS foram efetuadas com o objetivo de caracterizar a superfície do GCE, após a deposição do filme multicamada de CaM. A superfície do GCE foi caracterizada por voltametria cíclica e por EIS, usando como sonda redox o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

O voltamograma cíclico numa solução de 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com uma superfície limpa do GCE mostrou o comportamento eletroquímico característico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, com um pico reversível, a $E_a = +0,26$ V e $E_c = +0,16$ V, **Figura 6.5 (—)**.

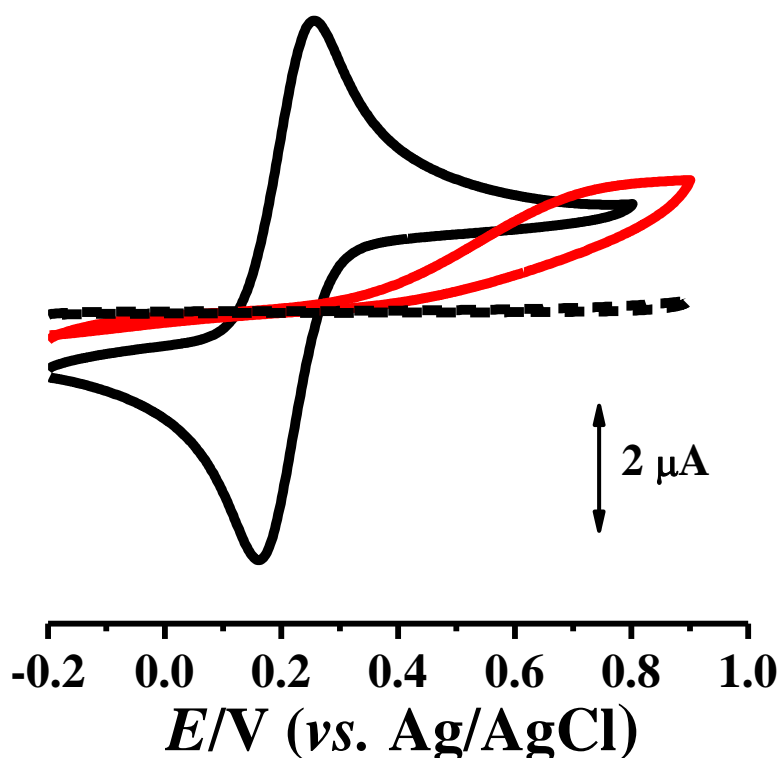


Figura 6.5 Voltamogramas cíclicos em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o (---) GCE limpo, (—) GCE em 3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e (—) GCE modificado com um filme multicamada de CaM em 3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.
 $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No entanto, o voltamograma cíclico obtido nas mesmas condições, mas com a superfície do GCE modificada com um filme multicamada de CaM em estado nativo, apresentaram o pico irreversível da oxidação do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ para $E_p = +0,70 \text{ V}$, **Figura 6.5 (—)**.

As experiências de EIS foram efetuadas para o potencial do par hexacianoferrato (III)/(II), $E_{ap} = +0,2 \text{ V}$, potencial aplicado ao GCE, e os gráficos no plano complexo foram registrados em soluções de 1, 3 e 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão tris/HCl 0,1 M), **Figura 6.6A**, e nas mesmas condições, para o eletrodo com a superfície modificada pelo filme multicamada de CaM, **Figura 6.6B**.

Nas medidas de EIS efetuadas em soluções de 1, 3 e 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, com a superfície do GCE sem o filme de CaM, **Figura 6.6 A**, foi possível observar duas regiões distintas, a parte semi-circular que ocorre a baixas frequências e corresponde ao processo de transferência de elétron, e uma parte linear que ocorre a frequências mais elevadas, devido à difusão. Ambas as partes, real e imaginária, da impedância, diminuíram com o aumento da concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A resistência à transferência de carga, representada pelo diâmetro do semi-círculo, é menor quanto maior a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução.

As medidas de EIS realizadas com uma superfície do GCE modificada com o filme multicamada de CaM apresentaram um semi-círculo que corresponde à ocorrência da reação de transferência de carga, **Figura 6.6B**. A resistência à transferência de carga (R_{ct}), representada pelo diâmetro do semi-círculo, é maior no GCE modificado pela CaM, em comparação com o eletrodo com a superfície limpa, **Figura 6.6A**.

Nas duas situações, com a superfície do GCE limpa e modificada pelo filme multicamada de CaM, os resultados foram os esperados, considerando que os valores de R_{ct} aumentam, com o aumento da concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

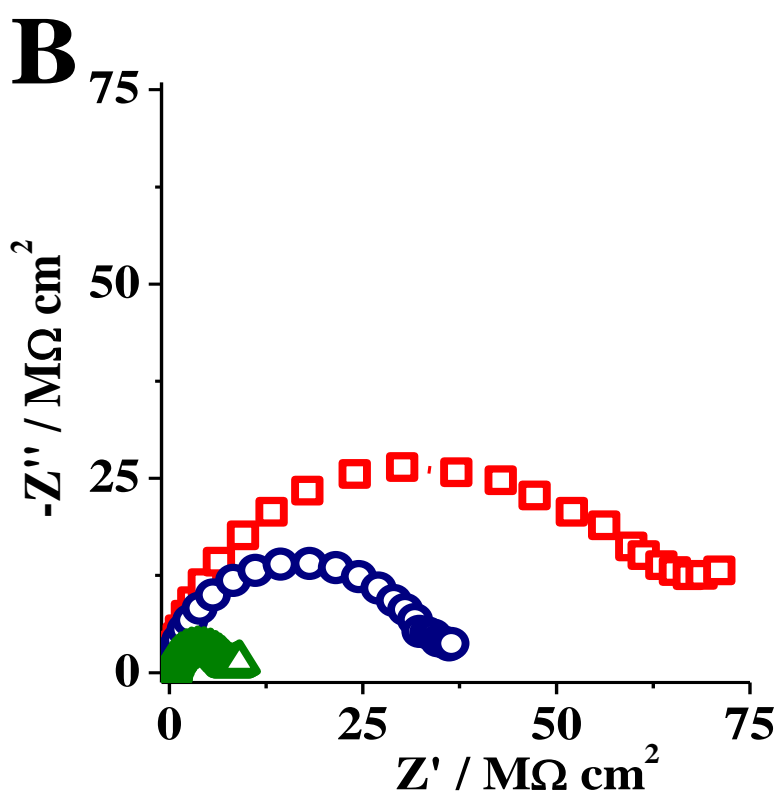
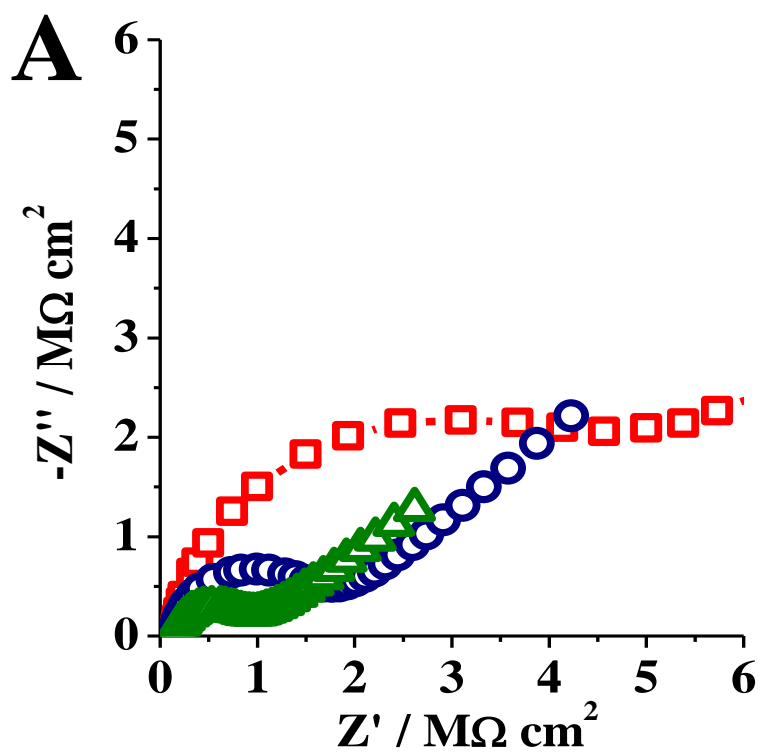


Figura 6.6 Espectros no plano complex, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão tris/HCl 0,1 M), para (□) 1, (○) 3 e (△) 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, potencial aplicado de $E_{ap} = +0,2$ V: (A) GCE limpo e (B) GCE modificado com um filme multicamada de CaM.

No caso do GCE modificado pelo filme multicamada de CaM, o processo redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ apresentou, para 1 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, um valor de $R_{\text{ct}} \sim 500 \text{ k}\Omega$, **Figura 6.6B** (curva \square), enquanto que para a mesma concentração, com o GCE limpo, apresentou o valor menor de $R_{\text{ct}} \sim 50 \text{ k}\Omega$, **Figura 6.6A** (curva \square). O aumento do valor R_{ct} no caso do GCE modificado com o filme multicamada de CaM ocorre porque a proteína ao ficar imobilizada na superfície do GCE, bloqueia a superfície do mesmo, impedindo a transferência eletrônica entre o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e a superfície do GCE, ficando apenas 10 % da superfície GCE descoberta.

6.3 Efeito dos agentes desnaturantes na oxidação da CaM

O estudo eletroquímico da influência dos agentes desnaturantes e redutores foi realizado usando uma superfície do GCE modificada com um filme multicamada de CaM, de acordo com o procedimento descrito na *Secção 2.4.1*.

Os processos de desnaturação provocam alterações morfológicas na estrutura 3D das proteínas, que se desdobram e cobrem a superfície do eletrodo, ficando os resíduos dos aminoácidos eletroativos mais acessíveis para a oxidação eletroquímica.

O agente desnaturante ureia afeta as estruturas secundária e terciária das proteínas, sem afetar a estrutura primária. Devido à sua elevada afinidade para as ligações peptídicas, a ureia quebra as ligações de hidrogénio e as pontes salinas entre as cadeias laterais positivas e negativas, destruindo assim a estrutura terciária da cadeia peptídica.

O SDS é utilizado como detergente desnaturante e atua através da dissolução de proteínas hidrofóbicas, enquanto que os agentes redutores DTT e TCEP, atuam através da quebra das ligações dissulfureto. Todos estes agentes químicos são importantes para investigar os mecanismos de oxidação das proteínas desnaturadas.

As moléculas DTT e TCEP apresentam comportamento eletroquímico na superfície do GCE, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão fosfato 0,1 M), mostrando um pico de oxidação a $E_p \approx + 1,15$ V para o DTT, e a $E_p \approx + 0,9$ V para o TCEP [282]. O SDS e a ureia não são eletroativos no GCE.

O voltamograma de DP registado na superfície do GCE modificada com um filme multicamada de CaM em estado nativo apresentou o pico de oxidação dos resíduos de Tyr, P_{Tyr} , a $E_p = + 0,66$ V, **Figura 6.7 (—)**, que corresponde à oxidação dos resíduos das tirosinas Tyr⁹⁹ e Tyr¹³⁸, e que está de acordo com os resultados da oxidação em solução da CaM, **Figura 6.3**.

O efeito dos agentes desnaturantes na oxidação eletroquímica foi sempre avaliado por comparação do comportamento do GCE modificado com o filme de CaM, **Figura 6.7 (—)**, que serviu de controlo, e as alterações foram observadas após a interação de cada um dos agentes. O GCE modificado com o filme de CaM foi preparado antes de cada experiência e foi efetuado um voltamograma de DP de controlo, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M).

O filme multicamada de CaM imobilizado no GCE foi desnaturado (procedimento descrito na *Secção 2.4.1*) após incubação em cada um dos agentes desnaturantes 50 mM SDS e TCEP, 10 mM DTT e 6M ureia, em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), durante os tempos de incubação de 30, 60, 120 e 180 minutos, **Figura 6.7**. O processo de oxidação da CaM desnaturada foi investigado por voltametria de DP.

Após incubação do GCE modificado com CaM na solução de 6 M de ureia, observou-se o aumento da corrente do pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos de Tyr, P_{Tyr} , a $E_p = + 0,66$ V, mas não se observaram novos picos de oxidação, **Figura 6.7A**.

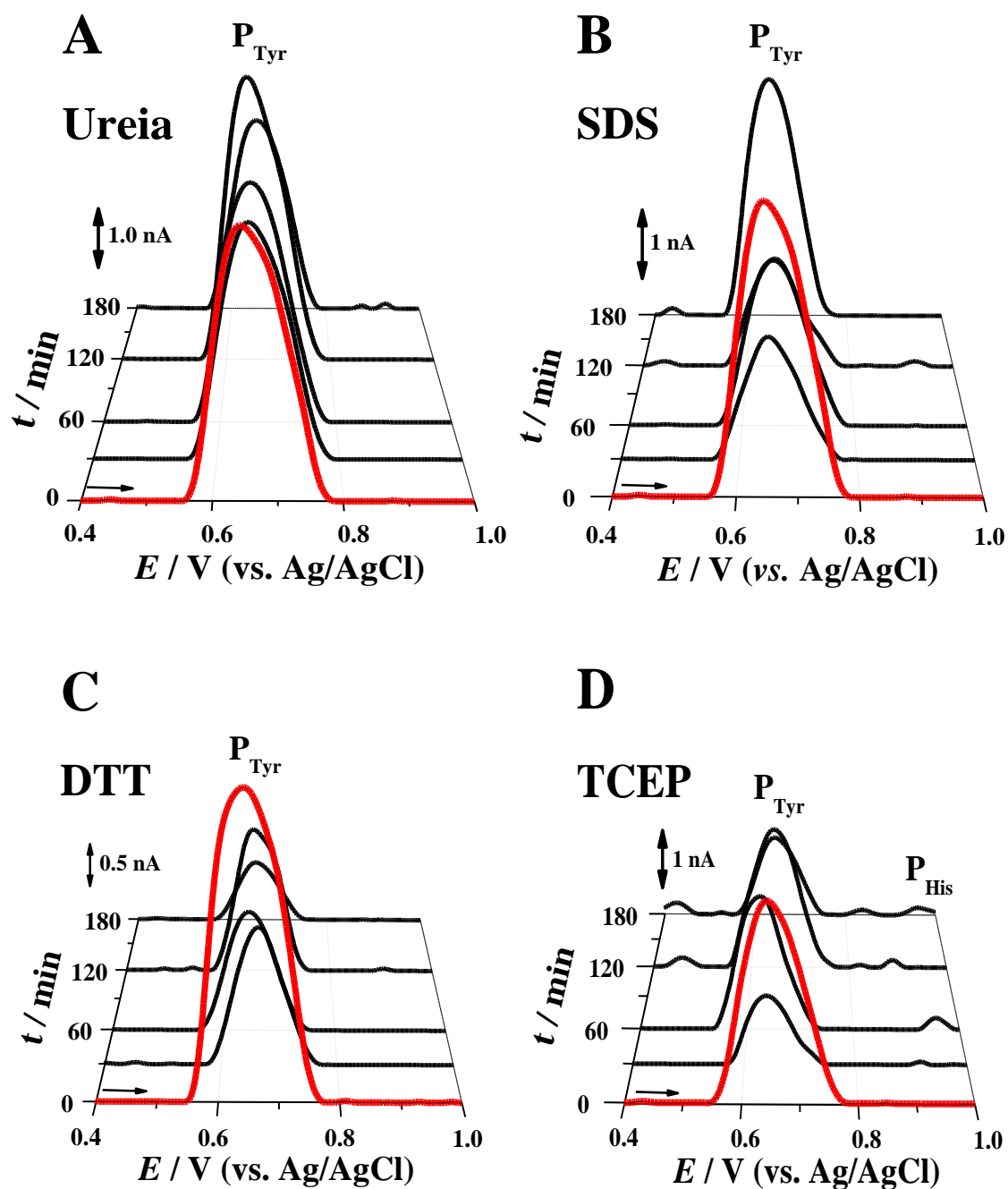


Figura 6.7 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, obtidos com o GCE modificado com um filme multicamada de CaM em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), (—) antes e (—) após a sua incubação em: (A) 6 M ureia, (B) 50 mM SDS, (C) 10 mM DTT, e (D) 50 mM TCEP. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A ureia provocou o desdobramento da estrutura da CaM, tornando os resíduos de aminoácidos de Tyr mais acessíveis à superfície do GCE, o que resultou no aumento da corrente do pico P_{Tyr} .

A incubação do GCE modificado com CaM na solução de SDS provocou uma diminuição acentuada da corrente do pico de oxidação dos resíduos de Tyr, P_{Tyr} , após 30 minutos de incubação, e também não se observaram novos picos de oxidação,

Figura 6.7B.

Aos 180 minutos de incubação na solução de SDS, a corrente do pico de oxidação P_{Tyr} aumentou novamente, devido ao efeito que o SDS provoca na estrutura da proteína. O SDS é um agente desnaturante que rompe as interações não covalentes por repulsão eletrostática, transformando a proteína numa cadeia linear polipeptídica.

Os agentes redutores DTT e TCEP não provocaram alterações significativas na oxidação da CaM, para além da diminuição da corrente do pico de oxidação P_{Tyr} , **Figura 6.7C e D.** O DTT e a TCEP são utilizados com o objetivo de quebrar as ligações dissulfureto dos resíduos de aminoácidos de cisteína [283]. Os resultados obtidos são coerentes, uma vez que, a CaM não contém na sua estrutura nenhum resíduo de cisteína e, por isso o DTT não provocou alterações significativas.

No entanto, após 60 min de incubação em TCEP, o voltamograma de DP, para além do pico da Tyr, P_{Tyr} , mostrou um novo pico de oxidação que corresponde à oxidação do resíduo do aminoácido Hys, a $E_P = 0,95$ V, **Figura 6.7 D**, o que significa que a estrutura 3D da CaM foi afetada pelo TCEP.

Em conclusão, a comparação dos resultados de voltametria de DP obtidos para a desnaturação do filme de CaM por cada um dos agentes, com o voltamograma de DP de controlo da CaM em estado nativo, **Figura 6.7(—)**, permite concluir que os agentes químicos utilizados afetaram de um modo geral a estrutura 3D da CaM, à exceção do

DTT que não revelou alterações significativas. O SDS e o DTT provocaram a diminuição da corrente do pico P_{Tyr} , devido à elevada reatividade destes agentes, que, ao provocarem o desenrolamento total da estrutura da CaM, fazem com que ocorra a adsorção de aminoácidos não eletroativos, diminuindo a área disponível na superfície do GCE. A incubação no TCEP alterou a estrutura da CaM porque além de aumentar a corrente de oxidação do pico P_{Tyr} , surgiu um novo pico P_{His} da oxidação dos resíduos do aminoácido His.

6.4 Caracterização eletroquímica das alterações conformacionais da CaM induzidas pelo cálcio

A CaM é uma proteína muito importante envolvida na regulação de vários processos metabólicos dependentes do cálcio. A ligação do cálcio à CaM provoca alterações conformacionais que levam a mudanças bioquímicas e celulares. Estruturalmente, a forma de CaM saturada de cálcio, HoloCaM, contém quatro sítios de ligação dos iões Ca^{2+} , **Figura 6.2B**.

Os sítios de ligação dos iões Ca^{2+} na proteína CaM contém aminoácidos de carga negativa em pH fisiológico: os Asp e Glu. Uma vez estabelecida a ligação com o Ca^{2+} ocorrem várias alterações na conformação da proteína que têm como resultado a alteração da sua estrutura secundária. Os resíduos electroactivos de Tyr estão situados próximo dos sítios de ligação do Ca^{2+} e qualquer alteração na estrutura secundária da CaM pode afectar o sinal redox da Tyr, ou seja, o seu potencial e a corrente do pico de oxidação.

O comportamento redox da CaM na presença de várias concentrações de Ca^{2+} foi investigado com o GCE, usando a voltametria de DP, em eletrólito inerte a pH = 7 (tampão Tris/HCl 0.1 M), **Figura 6.8**.

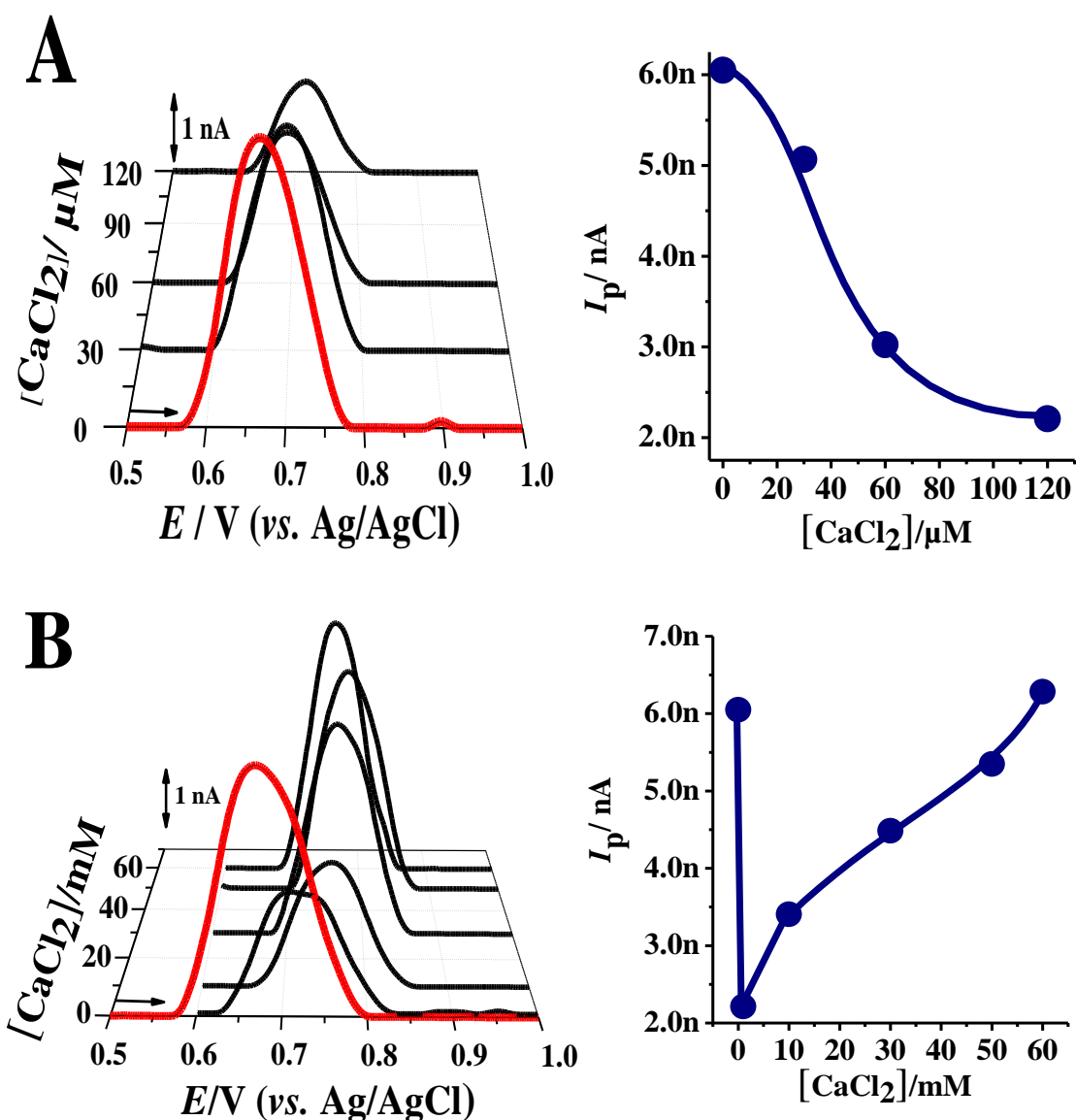


Figura 6.8 Voltamogramas de DP, com correção da linha de base, numa solução de 30 μM de CaM em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), na (—) ausência e (—) na presença de diferentes concentrações de $CaCl_2$: (A) 0, 30, 60 e 120 μM e (B) entre 0 e 60 mM. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas de DP numa solução de 30 μM de CaM, na ausência dos iões de Ca^{2+} , registaram um pico de oxidação P_{Tyr} , a $E_p = 0,66 \text{ V}$, que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr⁹⁹ e Tyr¹³⁸. Tendo em consideração a estrutura secundária da CaM, **Figura 6.2**, é provável que o aminoácido Tyr⁹⁹ seja mais facilmente oxidado do que o aminoácido Tyr¹³⁸, uma vez que este último está rodeado por 3 α -hélices.

Nos voltamogramas de DP numa solução de 30 μM de CaM, com concentrações de Ca^{2+} de 30 μM , 60 μM e 120 μM , o pico de oxidação P_{Tyr} apareceu ao mesmo potencial e a corrente permaneceu constante até 120 μM de Ca^{2+} , **Figura 6.8A**.

Aumentando a concentração de Ca^{2+} para 10 mM, a corrente do pico de oxidação P_{Tyr} permanece constante, mas o potencial do pico de oxidação do resíduo da Tyr⁹⁹ foi deslocado 100 mV para valores mais positivos, a $E_P \approx 0,76$ V, **Figura 6.8B**.

No entanto, nas soluções de 30 μM de CaM e concentrações superiores a 30 mM Ca^{2+} , a corrente do pico P_{Tyr} aumentou significativamente, apesar do potencial se manter constante, a $E_P \approx + 0,76$ V **Figura 6.8B**. A diminuição da corrente e o deslocamento do potencial do pico ocorrem devido às alterações conformacionais provocadas pelos iões Ca^{2+} na estrutura da CaM.

Para concentrações elevadas de iões de Ca^{2+} , o grupo fenólico da Tyr¹³⁸ permanece rodeado pelas 3 α -hélices, protegido da oxidação, mas o grupo fenólico da Tyr⁹⁹ fica mais próximo da parte central da proteína, **Figura 6.2B**, e a presença de resíduos de aminoácidos não eletroativos dificultam a sua oxidação porque diminuem a área disponível na superfície do GCE.

6.5 Caracterização por EIS das alterações conformacionais induzidas pelo cálcio

A influência da concentração dos iões de Ca^{2+} na superfície do GCE modificada com o filme multicamada de CaM, foi avaliada por EIS para o potencial do par hexacianoferrato (III)/(II), de $E_{ap} = + 0,2$ V, aplicado ao GCE, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão tris/HCl 0,1 M). As medidas foram efetuadas no GCE modificado com o filme multicamada de CaM, em soluções de 1, 3 e 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e na presença de diferentes concentrações de cálcio entre 60 μM e 1 mM, **Figura 6.9**.

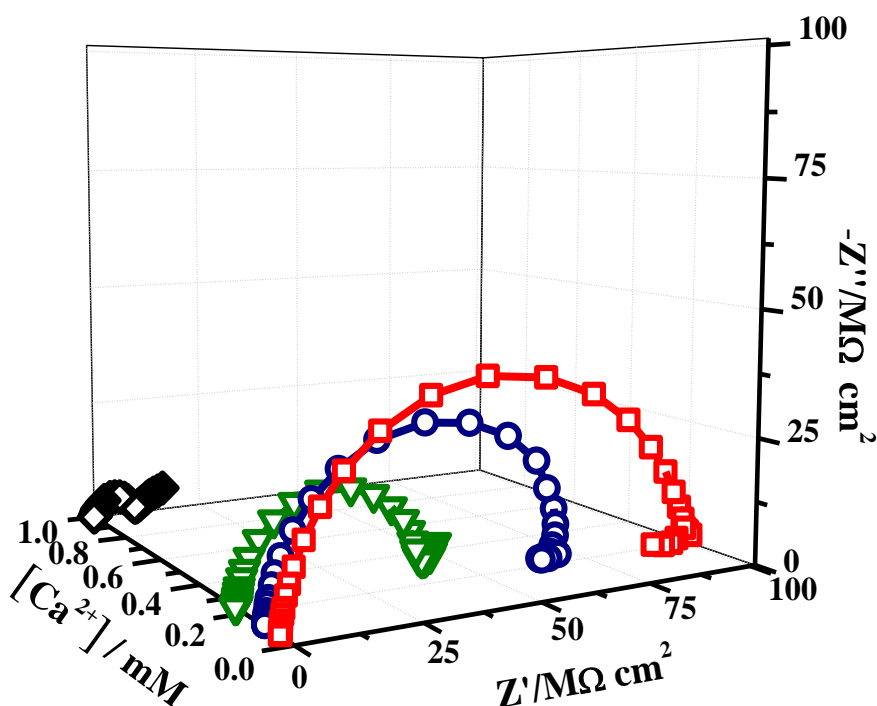


Figura 6.9 Espectros 3D de EIS no plano complexo, com o GCE modificado com filme de CaM, em 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, em eletrólito inerte a pH = 7.0 (tampão Tris/HCl 0.1 M), potencial aplicado de $E_{ap} = +0.2$ V, para diferentes concentrações de $CaCl_2$: (□) 60 μM , (○) 120 μM , (▽) 240 μM , e (◇) 1 mM.

Os espectros de EIS revelaram que ambas as partes, real e imaginária, da impedância diminuíram com o aumento da concentração de Ca^{2+} , **Figura 6.9**.

Para concentrações elevadas, 1 mM Ca^{2+} , foi possível observar duas regiões, uma parte semi-circular e uma parte linear. A parte semi-circular, que ocorre para frequências superiores, corresponde ao processo de transferência de elétron, enquanto a parte linear, que ocorre para frequências mais baixas, corresponde à difusão, **Figura 6.9**. Para concentrações $< 240 \mu M$ Ca^{2+} observou-se apenas o processo de transferência de elétron.

Para concentrações reduzidas de Ca^{2+} verificou-se a ocorrência de loops indutivos nas baixas frequências, que se devem ao facto de não ocorrerem alterações conformacionais na CaM. A estrutura da proteína é rígida e encontra-se adsorvida na

superfície do GCE, e apesar da conformação da CaM ser pouco favorável à oxidação, ainda permite a transferência de carga.

A modelação dos espectros de EIS, **Figura 6.9**, é feita de acordo com um circuito elétrico equivalente do tipo Randles, **Figura 6.10**, e com este circuito foram obtidos os valores apresentados na **Tabela 6.1**.

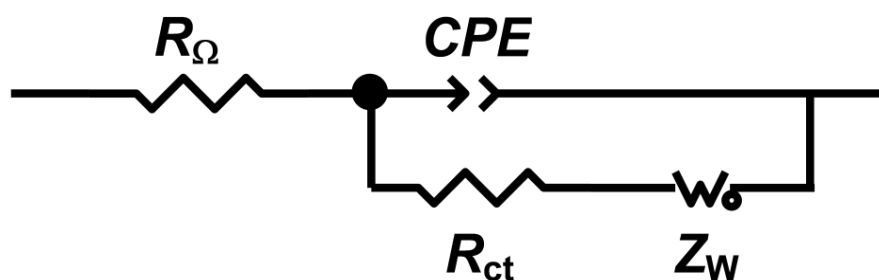


Figura 6.10 Circuito elétrico equivalente usado no ajuste dos dados de EIS.

Tabela 6.1 Dados de EIS, obtidos com a superfície do GCE modificada com um filme multicamada de CaM, em eletrólito inerte a pH = 7.0 (tampão Tris/HCl 0.1 M) e 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, para diferentes concentrações de Ca^{2+} , potencial aplicado de $E_{ap} = + 0,2$ V (**Figura 6.9**), ajustados com o circuito equivalente (**Figura 6.10**).

Ca^{2+} μM	R_{Ω} Ω	R_{ct} $k\Omega cm^2$	CPE_{dl} $\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1}$	α_1	Z_W $k\Omega cm^2 s^{\alpha-1}$	τ s	α_2
60	1,91	5,5	16,6	0,94	—	—	—
120	1,95	4,3	15,4	0,94	—	—	—
240	2,08	2,4	19,1	0,95	—	—	—
1000	2,12	0,5	15,4	0,94	1,7	200	0,42

Depois de proceder à análise do espectro de EIS através do ajuste dos dados, **Tabela 6.1**, verificou-se a diminuição da R_{ct} , com o aumento da concentração de Ca^{2+} na solução, o que significa que aumentou a área disponível na superfície do GCE.

A resistência à difusão aumentou com a concentração de Ca^{2+} e este efeito ocorreu devido às mudanças na conformação da CaM, de ApoCaM para HoloCaM.

Na presença de concentrações de Ca^{2+} mais elevadas, a proteína está na “forma aberta”, HoloCaM, provocada pela ligação do Ca^{2+} . Nesta forma a flexibilidade da proteína aumenta na superfície do eletrodo, permitindo que os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ alcancem a superfície do GCE mais facilmente, o que leva à diminuição do valor da resistência à transferência de carga. Ao mesmo tempo, a flexibilidade da proteína na forma HoloCaM dificulta o processo de difusão.

6.6 Caracterização gravimétrica das alterações conformacionais induzidas pelo cálcio

A agregação dos íons de Ca^{2+} na proteína CaM foi determinada usando a QCM, que permite a quantificação da massa na superfície do cristal, proporcional à frequência medida. No caso específico de filmes rígidos adsorvidos na superfície do cristal da QCM, a relação entre a massa adsorvida e a frequência medida é descrita pela equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = -2 \frac{f_0^2}{A\sqrt{\mu\rho}} \Delta m$$

onde f_0 é a frequência de ressonância do cristal (Hz), Δf é a variação de frequência (Hz), Δm é a variação de massa (g), A é a área piezoelétrica (cm^2), ρ a densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^3$) e μ é o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo corte AT = $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

As medidas gravimétricas foram realizadas com um cristal de quartzo coberto com ouro em ambas as faces e revestido com grafite (AuQC_Gr).

A superfície de grafite foi coberta com uma gota de 10 μL da solução 60 μM CaM, e seca à temperatura ambiente. Após secagem o cristal foi colocado na QCM e coberto com 5 mL de eletrólito inerte a $\text{pH} = 7.0$ (tampão Tris/HCl 0.1 M). De seguida, foram realizadas adições sucessivas de 10 mM CaCl_2 e registadas as variações de frequência entre cada adição. A frequência obtida após estabilização do sistema, antes das adições de CaCl_2 , foi considerada o valor de referência, utilizada para calcular a variação da frequência total. Após cada adição de 30 μL de CaCl_2 , a frequência correspondente foi medida, **Figura 6.11**. Os picos de frequência que se observam na **Figura 6.11A** ocorrem devido ao ruído provocado por cada adição.

A agregação dos iões Ca^{2+} pela CaM não ocorre uniformemente. Na primeira e segunda adição, a concentração de Ca^{2+} foi $\sim 120 \mu\text{M}$ e não se verificou nenhuma alteração na frequência, isto é, não ocorreu alteração de massa na superfície da grafite, **Figura 6.11B**. Após adição de 90 μL de 10 mM CaCl_2 , que corresponde a 180 μM de iões Ca^{2+} , verificou-se um aumento da massa na superfície da grafite, que resultou das adições sucessivas de CaCl_2 .

Consequentemente, a frequência começou a diminuir sucessivamente até a concentração de Ca^{2+} atingir $\sim 350 \mu\text{M}$. Os resultados foram os esperados uma vez que a conformação da proteína se altera e passa da forma ApoCaM para a forma HoloCaM, **Figura 6.2**. A variação de frequência total detetada depois das adições sucessivas de Ca^{2+} foi de 106 Hz. Tendo em conta a equação de Sauerbrey, foi determinado o aumento de massa na superfície do cristal de 0,12 μg de Ca^{2+} . O aumento ideal de massa deveria ser de $\sim 0,1 \mu\text{g}$ (valor calculado a partir da relação 1 CaM : 4 Ca^{2+}), ligeiramente inferior, o que indica que para além do aumento relacionado com a agregação dos quatro iões de Ca^{2+} à CaM, também ocorreu adsorção de iões de Ca^{2+} na superfície da grafite.

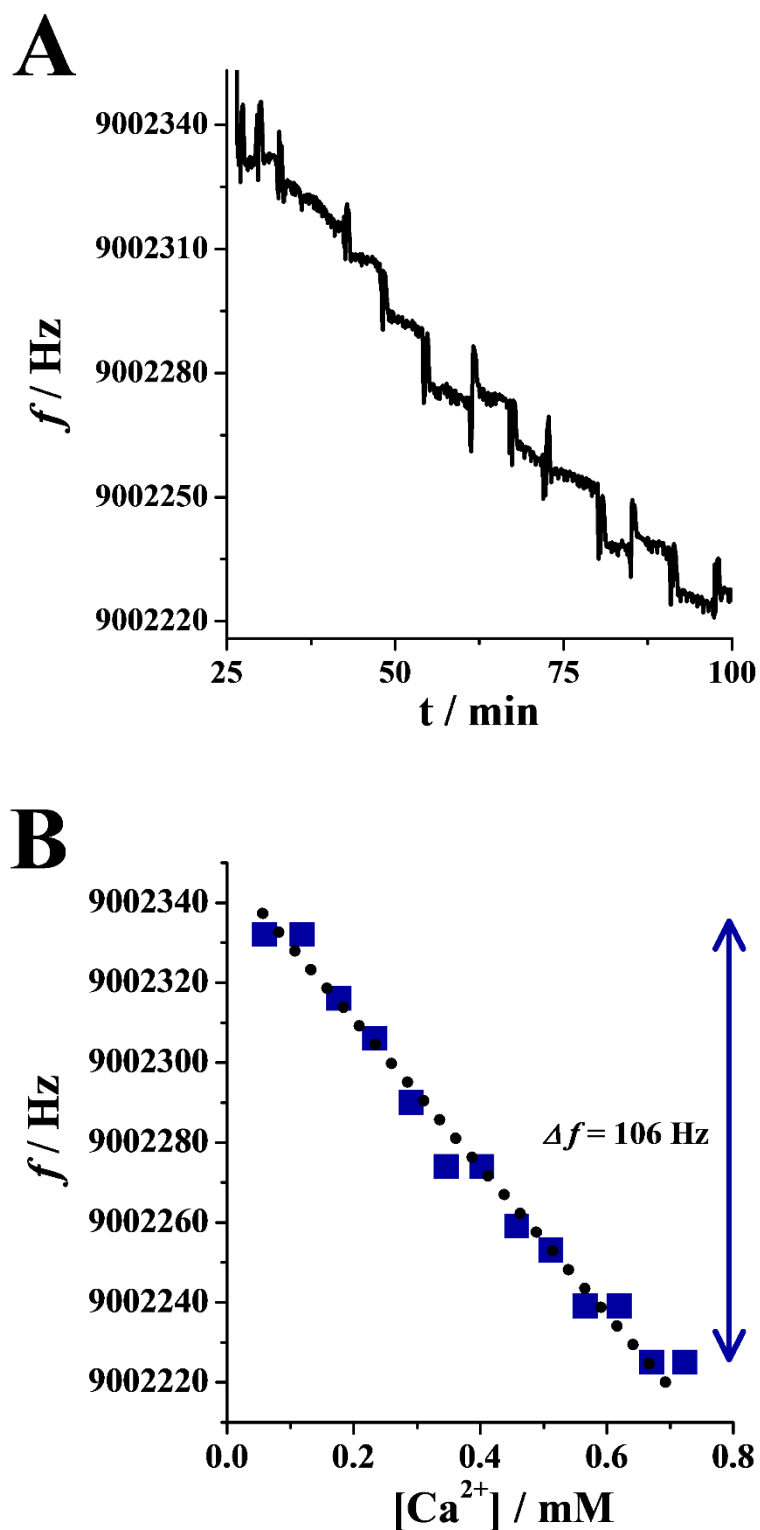


Figura 6.11 Variação de frequência, no cristal de quartzo coberto por um filme de ouro revestido com grafite que foi modificada com um filme monocamada de CaM em função: (A) tempo, após adições sucessivas de 30 μL de 10 mM CaCl_2 , e (B) concentração de Ca^{2+} na solução.

A CaM pode ligar-se a quatro iões de Ca^{2+} , conseqüentemente, a massa detetada na superfície do eléctrodo aumenta devido à agregação dos iões de Ca^{2+} . Para concentrações de $> 350 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , a frequência continua a diminuir, no entanto a diminuição não ocorre de um modo linear. Na presença de concentrações muito elevadas de Ca^{2+} , a proteína torna-se mais flexível à superfície da grafite, e esta flexibilidade dificulta a agregação dos iões de Ca^{2+} às moléculas de proteína CaM localizadas na parte mais interna do filme adsorvido na superfície do cristal.

6.7 Conclusões

A oxidação da proteína CaM, no estado nativo e depois de desnaturada, foi investigada por voltametria de DP. A oxidação da CaM nativa apresenta um pico anódico dependente do pH que corresponde à oxidação dos dois resíduos do aminoácido Tyr. Após desnaturação com agentes químicos, o potencial do pico de oxidação manteve-se inalterado, no entanto verificaram-se alterações significativas na corrente do pico de oxidação da Tyr. A ureia provocou o desdobramento da proteína e, como resultado, obteve-se um aumento do pico da Tyr. O SDS e o DTT desdobraram a estrutura 3D da CaM, mas provocaram uma diminuição acentuada na corrente do pico de oxidação dos resíduos de Tyr, devido à adsorção de resíduos de aminoácidos não eletroativos da CaM na superfície do GCE. O TCEP teve um comportamento semelhante mas observou-se a ocorrência de um novo pico, que corresponde à oxidação do resíduo do aminoácido His na cadeia da CaM.

A agregação dos iões de Ca^{2+} na proteína CaM é muito importante e foi investigada por voltametria de DP, EIS e QCM. Alterações significativas na corrente e no potencial do pico de oxidação dos resíduos de Tyr, em função da concentração de iões de Ca^{2+} presentes no meio, foram detectadas por voltametria de DP.

Os espectros de EIS obtidos com o GCE modificado com o filme de CaM revelaram o aumento da resistência à difusão com o aumento da concentração de Ca^{2+} , devido às alterações conformacionais que ocorreram na estrutura da CaM adsorvida na superfície do GCE, que na presença de Ca^{2+} mudou de ApoCaM para HoloCaM, tornando-se mais flexível, o que levou à diminuição do valor da resistência à transferência de carga.

A agregação dos íons de Ca^{2+} foi determinada por QCM, através da determinação da massa adsorvida na superfície da grafite, após medição da variação de frequência provocada pelas adições sucessivas de CaCl_2 .

Os resultados obtidos demonstraram que as alterações estruturais na conformação da CaM na presença de Ca^{2+} influenciam o comportamento eletroquímico dos resíduos dos aminoácidos Tyr e podem servir de base para o desenvolvimento de uma nova geração de biossensores com CaM para determinação de Ca^{2+} .

CAPÍTULO 7

Oxidação Eletroquímica das Caveolinas

As caveolinas são proteínas estruturais da membrana plasmática. Nos mamíferos apresentam três tipos diferentes, de estrutura e constituição muito semelhante, sendo elas a caveolina 1 (CAV-1), a caveolina 2 (CAV-2) e a caveolina 3 (CAV-3).

A CAV-1 é a proteína mais importante e é determinante para a estrutura e função das cavéolas. É uma proteína de 46 kDa e é formada por uma sequência de 178 resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária é formada por 5 α -hélices, duas das quais apresentam características hidrofóbicas, as hélices α 2b e α 3, que se situam no interior da membrana celular, no núcleo da bicamada lipídica, **Figura 7.1**.

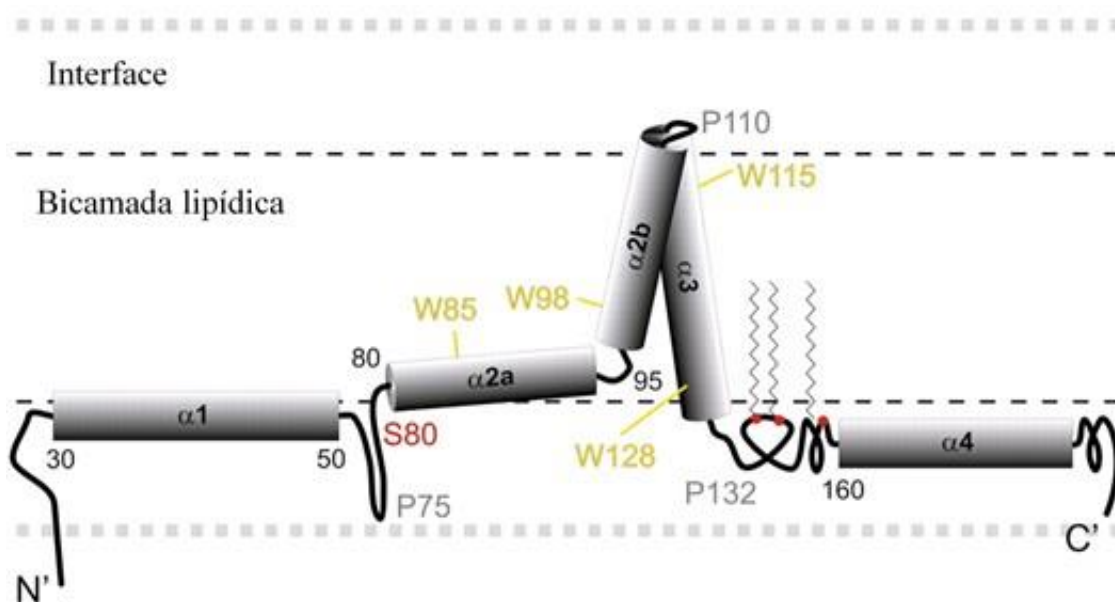


Figura 7.1 Esquema representativo da estrutura secundária da caveolina 1 (CAV 1), quando se encontra ligada à membrana celular (adaptado de [284]).

A análise da estrutura primária da CAV-1 mostra que, dos 178 resíduos de aminoácidos, existem vários resíduos de todos os aminoácidos com comportamento eletroquímico na superfície do GCE: 3 resíduos de Met, 9 resíduos de Tyr, 6 resíduos de His, 4 resíduos de Trp e 3 resíduos de Cys.

A CAV-2 é uma proteína de 44 kDa e é formada por uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos. Os resíduos de aminoácidos que apresentam comportamento eletroquímico são: 5 resíduos de Met, 4 resíduos de Tyr, 7 resíduos de His, 3 resíduos de Trp e 5 resíduos de Cys.

O isómero mais pequeno é a proteína CAV-3, com 43 kDa, que é formada por uma sequência de 151 resíduos de aminoácidos, dos quais: 2 resíduos de Met, 6 resíduos de Tyr, 4 resíduos de His, 4 resíduos de Trp e 9 resíduos de Cys apresentam comportamento eletroquímico.

O objetivo deste estudo foi a investigação do comportamento redox das proteínas caveolinas, em pH fisiológico. Os filmes de cada uma das caveolinas foi depositado na superfície do GCE e o seu comportamento eletroquímico foi avaliado por voltametria cíclica, de DP e de SW.

A estrutura tridimensional da proteína CAV-2 foi desnaturada através da acção dos agentes SDS, hidrócloro de guanidina (GuaHCl) e ureia, para diferentes tempos de incubação.

A CAV-1 é fundamental para a formação das cavéolas, devido à grande afinidade que tem com o colesterol. Neste sentido, as alterações no comportamento eletroquímico das caveolinas, provocadas pela interação com o colesterol, serão também avaliadas por voltametria de DP.

7.1 Oxidação das caveolinas CAV-1 e CAV-2 no GCE

A oxidação das proteínas CAV-1 e CAV-2 foi estudada por voltametria cíclica, de DP e de SW, em eletrólito inerte a pH fisiológico pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M). O estudo realizou-se com um filme fino de CAV-1 e CAV-2, que foi obtido cobrindo a superfície do GCE com 1 μ L de solução de 0,05 mg mL⁻¹ de cada uma das proteínas. Após secagem da primeira gota, o procedimento foi repetido mais uma vez, de modo a obter uma cobertura total da superfície do GCE pelas caveolinas.

7.1.1 Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos registados com um filme de CAV-1 apresentaram um pico de oxidação, a $E_p = + 0,67$ V, que corresponde à oxidação dos resíduos de aminoácidos de Tyr, P_{Tyr} , e o primeiro pico do Trp, P_{Trp}^1 , **Figura 7.2**.

Com o aumento do número de varrimentos, sem limpar o GCE, verificou-se que a intensidade da corrente do pico diminui consideravelmente, devido à formação dos produtos de oxidação dos resíduos de Tyr e do Trp não eletroativos na superfície do GCE. Na CAV-1, **Figura 7.2**, foi observado apenas o pico correspondente aos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, a $E_p = + 0,67$ V [105,106,112].

Na estrutura primária da CAV-1, para além dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp, também existem resíduos dos aminoácidos His, Cys e Met. No entanto, a estrutura tridimensional da CAV-1, em conjunto com a posição que a CAV-1 adopta no momento da adsorção na superfície do GCE, tornam difícil a oxidação da CAV-1, não sendo possível observar o segundo pico da oxidação do Trp, que deveria aparecer a $E_{Trp}^2 = + 1,05$ V, nem os picos correspondentes à oxidação da Met, a $E_{Met}^1 = + 1,12$ V e

$E_{\text{Met}}^2 = + 1,35 \text{ V}$, da Cys, a $E_{\text{Cys}}^1 = + 0,52 \text{ V}$, $E_{\text{Cys}}^2 = + 0,88 \text{ V}$ e $E_{\text{Cys}}^3 = + 1,27 \text{ V}$, e da His, a $E_{\text{His}} = + 1,15 \text{ V}$ [105,106,112].

A oxidação eletroquímica da CAV-2 foi estudada por voltametria cíclica, nas mesmas condições, e os voltamogramas cíclicos obtidos apresentaram um pico de oxidação, a $E_p = + 0,85 \text{ V}$, que também corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr, P_{Tyr} , e o primeiro pico do triptofano, P_{W}^1 , **Figura 7.3**.

Os voltamogramas cíclicos das proteínas CAV-1 e CAV-2 foram registados nas mesmas condições, no entanto, os resultados obtidos apresentaram uma diferença no potencial do pico observado, que se deve à estrutura e conformação das proteínas, que apesar de pertencerem à mesma família apresentam diferenças tanto na sequência e dos aminoácidos como na própria estrutura tridimensional.

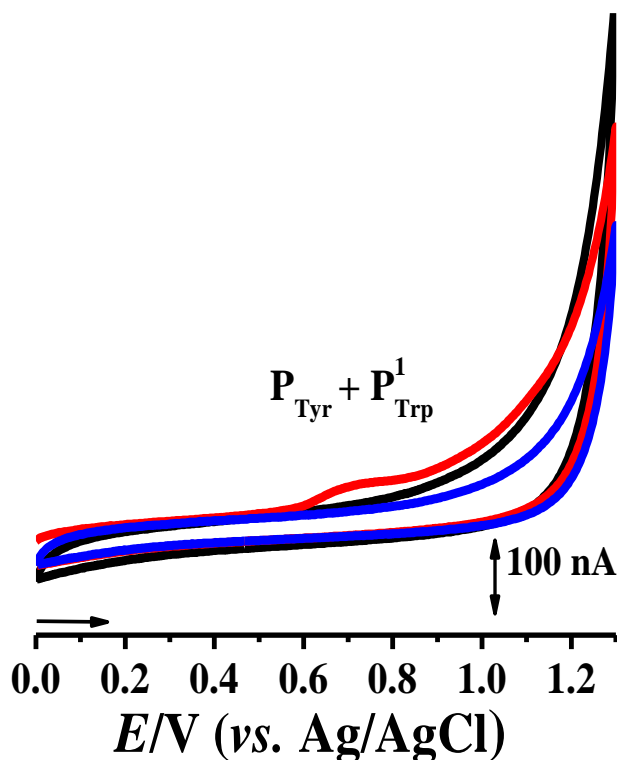


Figura 7.2 Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), com o GCE limpo (—) e com um filme de CAV-1 adsorvido, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A estrutura primária da CAV-2 contém 5 resíduos do aminoácido Cys, mais 2 resíduos do que a CAV-1, 4 resíduos do aminoácido Tyr e 3 resíduos do aminoácido Trp, menor número em comparação com a CAV-1.

Tendo em conta os potenciais obtidos na oxidação da CAV-1, **Figura 7.2**, no qual se verificou o desvio de 150 mV, para valores mais positivos relativamente à oxidação da CAV-2, **Figura 7.3**, foi possível concluir que neste processo de oxidação, além da oxidação dos resíduos de aminoácidos de Tyr e de Trp, também ocorre a oxidação dos resíduos do aminoácido Cys, a $E_{Cys}^2 = +0,88$ V.

A oxidação dos resíduos dos aminoácidos Met e His, assim como o primeiro e terceiro pico da oxidação da Cys não foram observados, devido à posição destes resíduos na estrutura da CAV-2, que dificultou o processo de oxidação.

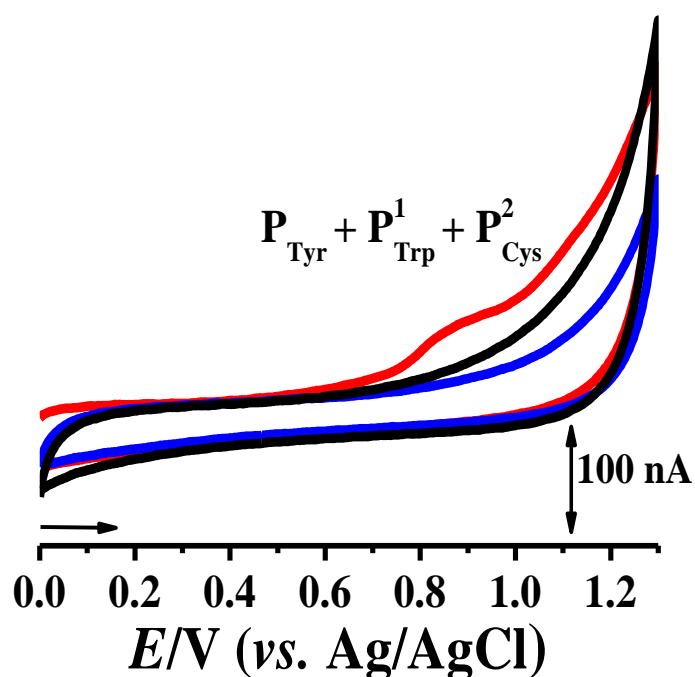


Figura 7.3 Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrólito inerte pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), com o GCE limpo (—) e com o GCE com um filme de CAV-2 adsorvido, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos, $v = 100$ mV s⁻¹.

As correntes de pico de oxidação obtidas para os resíduos de aminoácidos dentro das caveolinas são sempre menores relativamente às correntes de pico observadas para os respectivos aminoácidos livres em solução [105,106,112], devido à conformação das proteínas adsorvidas na superfície do GCE.

7.1.2 Voltametria de onda quadrada

As experiências de voltametria de SW realizadas com as proteínas CAV-1 e CAV-2, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M) apresentaram um pico de oxidação irreversível, a $E_p = + 0,68$ V para a CAV-1, que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr e Trp, **Figura 7.4A**, e a $E_p = + 0,87$ V para a CAV-2, que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr, Trp e segundo pico da oxidação da Cys, **Figura 7.4B**. Os voltamogramas de SW obtidos apresentaram um comportamento idêntico ao observado por voltametria cíclica.

7.1.3 Voltametria de impulso diferencial

A voltametria de DP é uma técnica muito mais sensível e por isso é muito útil para esclarecer os processos de eletrodo.

As experiências de voltametria de DP realizadas com um filme de CAV-1 em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), **Figura 7.5**, apresentaram no primeiro varrimento, três picos de oxidação: o pico ($P_{Tyr} + P_{Trp}^1$) que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr e Trp, a $E_p = + 0,65$ V, que foi também observado por voltametria cíclica, seguido para potenciais mais elevados por dois novos picos, o segundo pico da oxidação da Cys, o pico P_{Cys}^2 , a $E_p = + 0,89$ V, e o segundo da oxidação do Trp, o pico P_{Trp}^2 , a $E_p = + 0,88$ V, **Figura 7.5**.

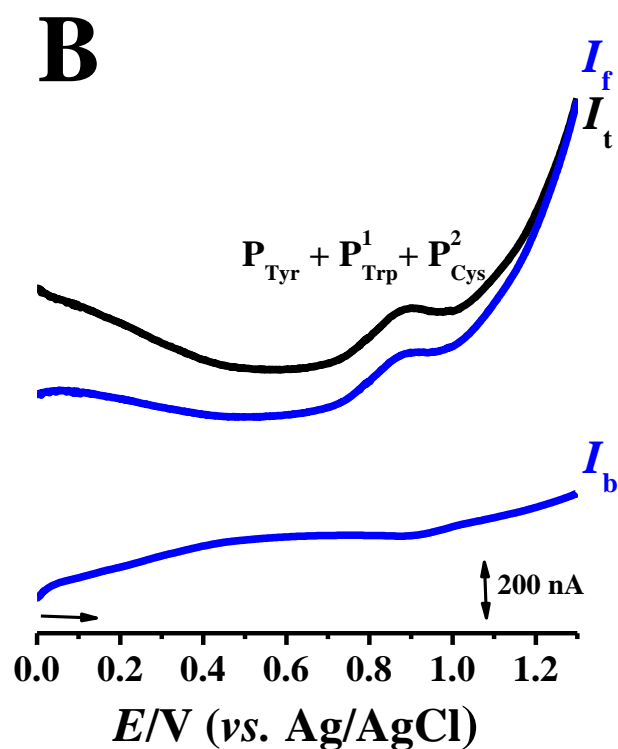
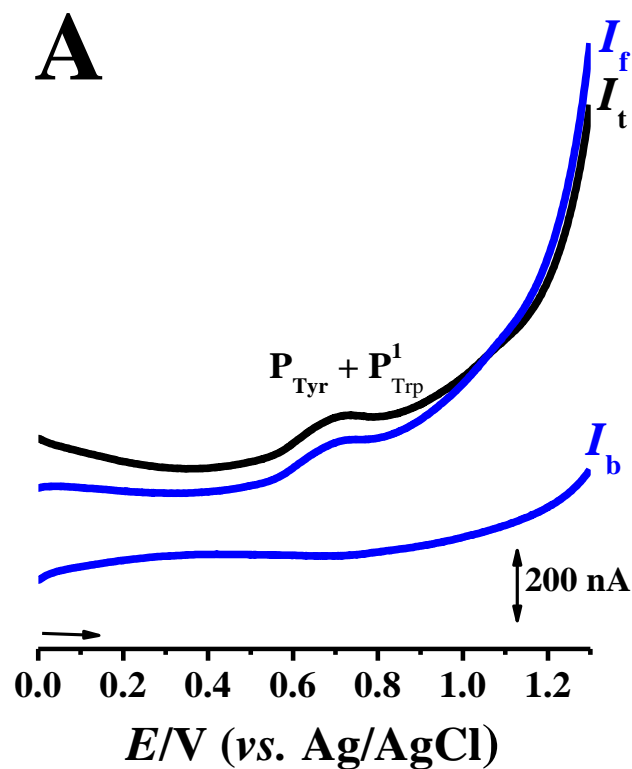


Figura 7.4 Voltamogramas de SW, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o GCE com um filme adsorvido de (A) CAV-1 e (B) CAV-2; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2\text{mV}$, amplitude de pulso 50 mV, $v_{\text{ef}} = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (—) I_t – corrente total e (—) I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa.

No voltamograma de DP seguinte, registado na mesma solução e sem limpar a superfície do GCE, apareceu um novo pico de oxidação a potenciais menos positivos, P_{Trp}^4 , a $E_p = + 0,33$ V, **Figura 7.5**. Estes novos picos estão associados à oxidação dos produtos de oxidação dos resíduos de Tyr e de Trp formados durante o primeiro varrimento.

Deste modo, em comparação com a voltametria cíclica, foi possível observar os dois processos de oxidação que ocorreram a potenciais mais elevados, e os respetivos produtos de oxidação da Tyr e do Trp. A intensidade de corrente muito reduzida dos produtos de oxidação e do pico de oxidação dos resíduos de Cys e o segundo pico do Trp justificam-se com a conformação da CAV-1 adsorvida na superfície do GCE, que determina a acessibilidade dos resíduos dos aminoácidos eletroativos.

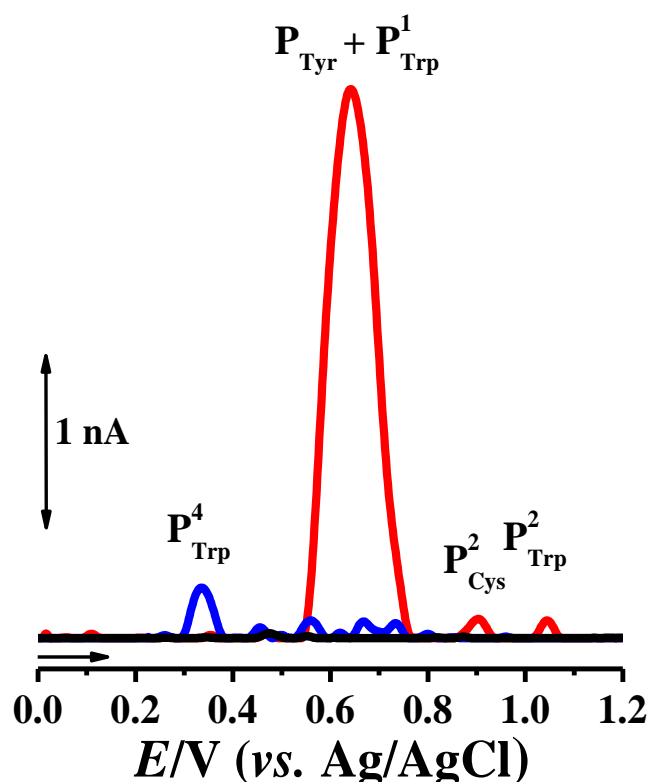


Figura 7.5 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o GCE limpo (—) e com o GCE com um filme de CAV-1 adsorvido, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As experiências de voltametria de DP realizadas com um filme de CAV-2 em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M) apresentaram, no primeiro varrimento, um pico de oxidação, a $E_p = +0,78$ V, **Figura 7.6**, que está associado com a oxidação do resíduo de aminoácido Cys. No entanto, verificou-se um desvio de 100 mV para potenciais menos positivos, o que poderá indicar que este pico possa estar associado à oxidação simultânea dos resíduos de Trp e Cys.

No segundo varrimento, realizado na mesma solução e sem limpar o GCE, apareceram dois novos picos de oxidação, P_{Trp}^3 a $E_p = +0,19$ V e P_{Trp}^4 a $E_p = +0,47$ V, **Figura 7.6**. Os picos de oxidação P_{Trp}^3 e P_{Trp}^4 obtidos no segundo varrimento estão associados à oxidação dos produtos de oxidação dos resíduos do aminoácido Trp, formados na superfície do GCE durante o primeiro varrimento.

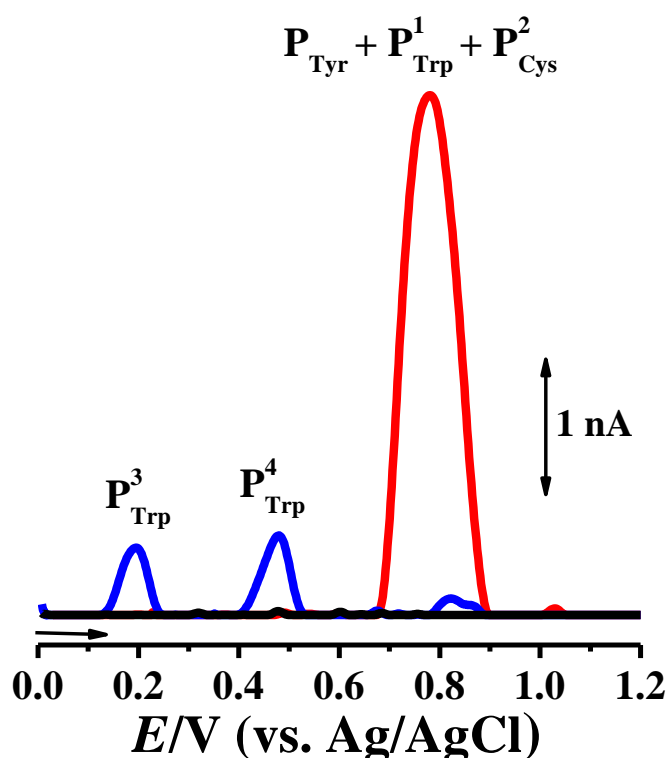


Figura 7.6 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o GCE limpo (—) e com o GCE com um filme de CAV-2 adsorvido, (—) primeiro e (—) segundo varrimentos. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As diferenças de potenciais obtidas nos voltamogramas de DP da CAV-1, **Figura 7.5** e da CAV-2, **Figura 7.6**, estão associadas às estruturas das proteínas CAV-1 e CAV-2, que apesar da sequência de aminoácidos ser semelhante, apresentam diferenças relativamente ao número de resíduos eletroativos, além das diferentes conformações adotadas durante a adsorção na superfície do GCE, que, por sua vez, também influência na oxidação dos resíduos aminoácidos eletroativos.

7.2 Efeito dos agentes desnaturantes na oxidação da CAV-2

Uma vez que as CAV-1, CAV-2 e CAV-3 pertencem à mesma família das caveolinas e apresentam características e estrutura semelhante, o estudo eletroquímico da influência dos agentes desnaturantes foi realizado na CAV-2, por apresentar maior número de picos de oxidação nas medidas voltamétricas efetuadas.

Os processos de desnaturação provocam alterações morfológicas na estrutura das proteínas, o que faz com que os resíduos dos aminoácidos eletroativos fiquem mais acessíveis para a oxidação eletroquímica.

O filme de CAV-2 imobilizado no GCE foi desnaturado utilizando o procedimento descrito na *Secção 2.4.1*. Após incubação nos agentes 50 mM de SDS, 6 mM de GuaHCl e 6M de ureia, em eletrólito inerte a pH = 7,0 (tampão Tris/HCl 0,1 M), durante os tempos de incubação de 15, 30, e 120 minutos, **Figura 7.7**, a oxidação da CAV-2 desnaturada foi investigada por voltametria de DP.

O efeito dos agentes desnaturantes na oxidação eletroquímica foi avaliado por comparação do comportamento do GCE modificado com o filme de CAV-2 no estado nativo, **Figura 7.7** (—), que serviu de controlo, e avaliadas as alterações observadas após a interação de cada um dos agentes.

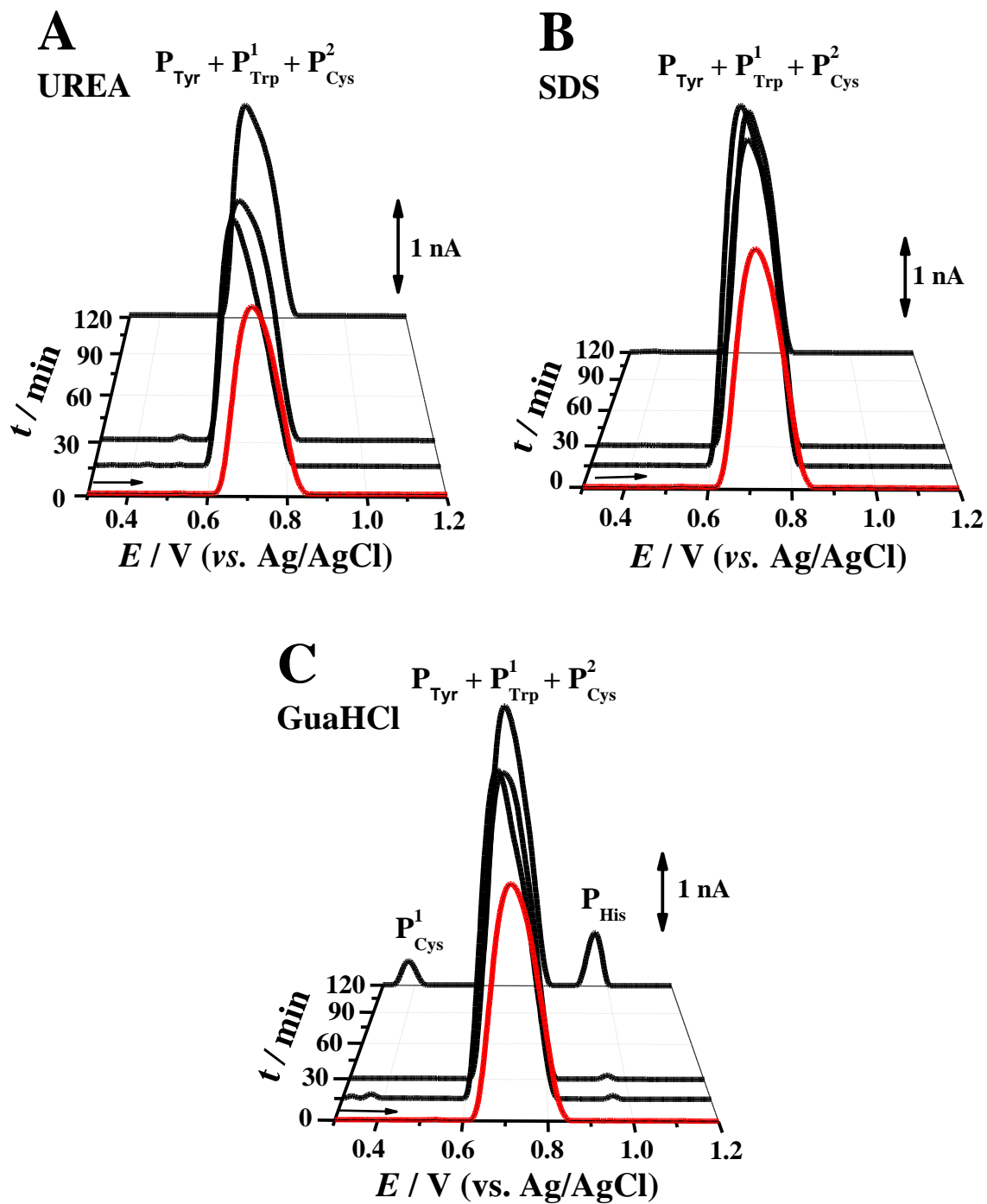


Figura 7.7 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o GCE com o filme de CAV-2 adsorvido, (—) antes e (—) após a incubação em: (A) 6 M ureia, (B) 50 mM SDS, (C) 6M GuaHCl. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Após incubação do GCE com o filme CAV-2 na solução de 6 M de ureia observou-se o aumento da corrente do pico de oxidação dos aminoácidos Tyr, Trp e Cys, a $E_p = + 0,78$ V, e um ligeiro desvio no potencial de $\sim 0,70$ V, para valores menos positivos, **Figura 7.7A**. No entanto, após a desnaturação na presença de ureia, não se observaram novos picos de oxidação. Este comportamento manteve-se constante ao longo do tempo de incubação. A ureia afetou a estrutura da proteína CAV-2, facilitando o acesso dos aminoácidos eletroativos à superfície do GCE, uma vez que se verificou o aumento da corrente do pico de oxidação ($P_{Tyr} + P_{Trp}^1 + P_{Cys}^2$).

Após 15 min de incubação do GCE com o filme CAV-2 na solução de 50 M de SDS, **Figura 7.7B**, observou-se um aumento da corrente do pico de oxidação ($P_{Tyr} + P_{Trp}^1$), o que significa que ocorreu uma alteração na estrutura da CAV-2, que facilitou a oxidação dos aminoácidos eletroativos. O SDS é um agente desnaturante que quebra as interações não covalentes por repulsão eletrostática, alterando a estrutura da CAV-2 para uma cadeia linear polipeptídica, daí o aumento da corrente do pico de oxidação.

No entanto, após 30 min de incubação, observou-se que a corrente do pico de oxidação diminuiu, **Figura 7.7B**, ou seja, ocorreu o desenrolamento total da estrutura da CAV-2, que levou à interação dos resíduos dos aminoácidos não eletroativos, e a sua adsorção na superfície do GCE, resultando na diminuição da área disponível do GCE para ocorrer a oxidação. Em todos os tempos de incubação ocorreu um ligeiro desvio no potencial do pico de oxidação para valores menos positivos.

O agente desnaturante GuaHCl causou um comportamento idêntico à ureia. Após 30 min de incubação do GCE com o filme CAV-2 na solução de 6 M de GuaHCl observou-se o aumento da corrente do pico de oxidação ($P_{Tyr} + P_{Trp}^1$) e o desvio no potencial para valores menos positivos, **Figura 7.7C**.

Após 120 min de incubação observaram-se dois novos picos de oxidação, que correspondem ao primeiro pico de oxidação dos resíduos dos aminoácidos Cys, P_{Cys}^1 , a $E_P = 0,40$ V, e o pico de oxidação da His, P_{His} , a $E_P = 0,98$ V, **Figura 7.7C**, o que significa que a estrutura 3D da CAV-2 foi afetada pela GuaHCl, que provocou o desenrolamento da proteína, ficando os aminoácidos eletroativos mais acessíveis na superfície do GCE e facilitando a sua oxidação.

A comparação dos resultados obtidos para a desnaturação do filme de CAV-2, com o voltamograma de DP de controlo, da CAV-2 em estado nativo, **Figura 7.7(—)**, permite concluir que os três agentes desnaturantes afetaram de um modo geral a estrutura da CAV-2.

A ureia e a GuaHCl provocaram o desenrolamento da estrutura da CAV-2 facilitando o acesso dos resíduos de aminoácidos à superfície do GCE. A GuaHCl foi mais eficaz a desnaturar a CAV-2, pois foram observados novos picos de oxidação dos resíduos dos aminoácidos Cys e Hys. No entanto, verifica-se um desvio para valores menos positivos, no potencial destes picos, em comparação com o potencial de oxidação dos aminoácidos Cys e His em solução, o que poderá indicar que outros resíduos de aminoácidos não eletroativos adsorvem na superfície do GCE, diminuindo a área disponível para a oxidação.

A ureia e a GuaHCl interagem de maneira semelhante com as proteínas, daí o comportamento observado ser idêntico. Apesar de não serem considerados desnaturantes químicos fortes, exercem a sua ação através de muitas interações fracas na estrutura das proteínas [285]

7.3 Caracterização eletroquímica da interação das caveolinas com o colesterol

As cavéolas são invaginações endocíticas/exocíticas da membrana plasmática que podem ocorrer em diferentes densidades e diferentes tipos de células, muito ricas em colesterol, glicosfingolipídios, caveolinas e outras proteínas. Entre as várias funções que possuem, estão associadas ao transporte reverso do colesterol e ao metabolismo lipídico.

As caveolinas são as proteínas estruturais essenciais para a formação das cavéolas, e em particular a CAV-1 é determinante para a estrutura e função das cavéolas. A CAV-1 tem uma grande afinidade com o colesterol e é responsável pela ligação dos principais componentes das cavéolas, que são o colesterol e os esfingolipídios, além disso, também ajuda na regulação dos níveis de colesterol nas células.

A ligação da CAV-1 ao colesterol ocorre no interior da bicamada lipídica das membranas celulares, através dos resíduos de aminoácidos 82-101 [284], entre os quais existem 4 resíduos de aminoácidos eletroativos, 2 resíduos de Tyr e 2 resíduos de Trp.

Estes resíduos situam-se numa região que possui duas α -hélices que apresentam características hidrofóbicas, as hélices $\alpha 2b$ e $\alpha 3$, **Figura 7.1**. Deste modo a interação da CAV-1 na superfície do GCE é facilitada através da interação hidrofóbica estabelecida por esta região com a superfície hidrofóbica do eléctrodo, facilitando a oxidação destes aminoácidos. A ligação com o colesterol vai provocar alterações conformacionais que levam a mudanças bioquímicas e celulares e é possível que ocorram alterações no comportamento eletroquímico da CAV-1. O comportamento redox das proteínas CAV-1, CAV-2 e CAV-3 na presença de colesterol foi investigado com o GCE, usando a voltametria de DP, em eletrólito inerte a pH = 7 (tampão Tris/HCl 0.1 M).

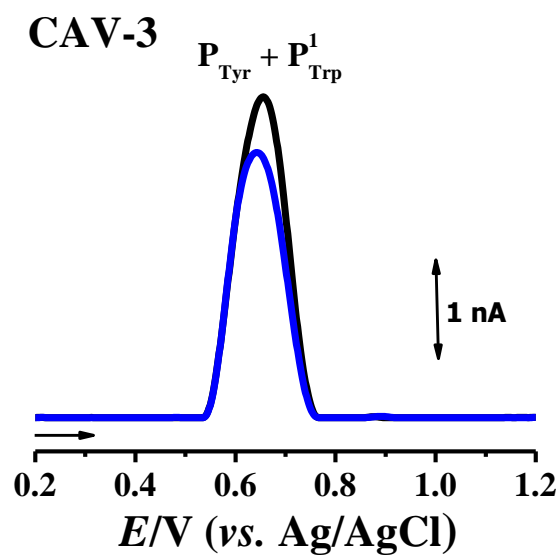
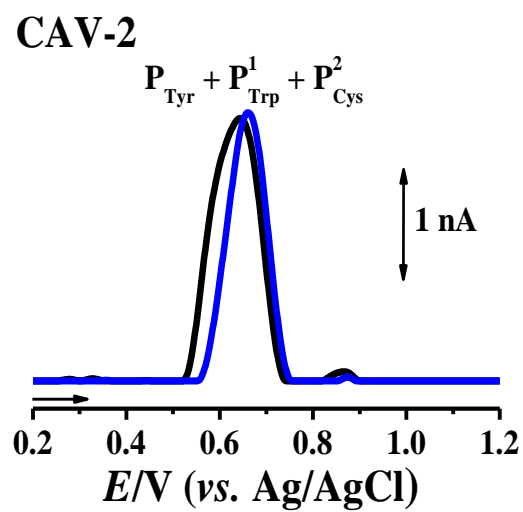
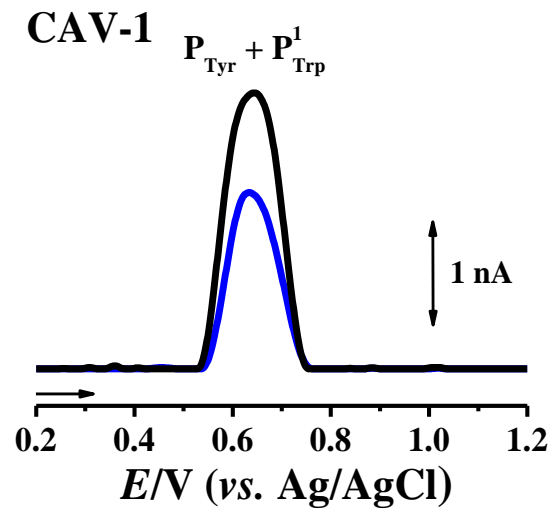


Figura 7.8 Voltamogramas de DP com correção de linha de base, em eletrólito inerte a $\text{pH} = 7,0$ (tampão Tris/HCl 0,1 M), obtidos com o GCE com um filme adsorvido de CAV-1, CAV-2 e CAV-3, (—) antes e (—) depois da interação com 10 mM de colesterol. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas de DP obtidos no GCE com um filme de CAV-1 adsorvido registaram um pico de oxidação a $E_p = 0,65$ V, que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr e Trp, ($P_{\text{Tyr}} + P_{\text{Trp}}^1$), **Figura 7.8(—)**. Nas experiências de voltametria de DP, realizadas nas mesmas condições, mas desta vez numa solução de 10 mM de colesterol, em eletrólito inerte a pH = 7 (tampão Tris/HCl 0.1 M), observou-se o pico de oxidação ($P_{\text{Tyr}} + P_{\text{Trp}}^1$) no mesmo potencial, no entanto a intensidade de corrente diminuiu consideravelmente, de $I_p = 2.63$ nA para $I_p = 1.67$ nA, **Figura 7.8(—)**, devido à interação do colesterol com a CAV-1 adsorvida na superfície do GCE.

Relativamente à CAV-2, nos voltamogramas de DP não se verificaram alterações significativas nas experiências, **Figura 7.8**. A presença de colesterol não influenciou a estrutura 3D da proteína CAV-2, tal como era esperado uma vez que a CAV-2 não interage com o colesterol.

O mesmo resultado foi observado nos voltamogramas de DP realizados no GCE com um filme de CAV-3 adsorvido. No entanto, com o filme de CAV-3, nos voltamogramas de DP ocorreu uma ligeira diminuição da intensidade do pico de oxidação ($P_{\text{Tyr}} + P_{\text{Trp}}^1$), de $I_p = 3,14$ nA para $I_p = 2.65$ nA, **Figura 7.8**.

Os resultados obtidos foram os esperados, uma vez que apenas a CAV-1 tem afinidade para o colesterol e, neste sentido, o comportamento eletroquímico dos resíduos dos aminoácidos de Tyr e de Trp foi afetado pela interação da CAV-1 com o colesterol.

No domínio de ligação da CAV-1 com o colesterol, existem 2 resíduos de Tyr e 2 resíduos de Trp, e estes resíduos situam-se em duas α -hélices e na proximidade de uma terceira α -hélice. A interação com o colesterol alterou de tal forma a conformação da CAV-1, que a oxidação destes resíduos foi impedida, verificando-se a diminuição da corrente do pico.

7.4 Conclusões

As caveolinas, CAV-1, CAV-2 e CAV-3, são proteínas estruturais muito semelhantes, tanto na estrutura como na cadeia de resíduos de aminoácidos. As caveolinas fazem parte da estrutura das cavéolas, sendo a CAV-1 uma proteína fundamental para a formação das mesmas.

A oxidação das proteínas CAV-1 e CAV-2 no estado nativo foi investigada por voltametria cíclica, de DP e de SW. A oxidação da CAV-1 nativa apresenta um pico anódico que corresponde à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Tyr e Trp. A oxidação da CAV-2 também apresentou um pico de oxidação, mas a potenciais mais elevados, o que significa que também foram oxidados os resíduos dos aminoácidos Cys.

Após desnaturação da CAV-2 com agentes químicos, o potencial do pico de oxidação desviou-se ligeiramente, no entanto verificaram-se alterações significativas na corrente do pico. A ureia provocou o desdobramento da proteína e como resultado obteve-se uma melhoria no comportamento eletroquímico para o pico da Tyr e do Trp. O SDS desdobrou a estrutura 3D da CAV-2 mas provocou uma diminuição na corrente do pico de oxidação, devido à adsorção de resíduos não eletroativos da CAV-2 na superfície do GCE que diminuíram a área disponível na superfície do GCE. A GuaHCl teve um comportamento semelhante à ureia mas observaram-se dois novos picos de oxidação que correspondem à oxidação dos resíduos dos aminoácidos Cys e His.

A interação da CAV-1 com o colesterol é muito importante porque, graças à elevada afinidade com o colesterol, a CAV-1 liga os principais componentes da formação das cavéolas, colesterol e esfingolipídios, além de ajudar na regulação dos níveis de colesterol nas células. A interação com o colesterol induz alterações na conformação da proteína, que se refletem no comportamento eletroquímico da CAV-1. De facto, registou-se uma alteração no comportamento eletroquímico do pico de

oxidação observado, provocada pela interação da CAV-1 com o colesterol, tendo ocorrido a diminuição da corrente do pico de oxidação. As proteínas CAV-2 e CAV-3 não interagem com o colesterol e por isso não se verificaram alterações significativas no comportamento eletroquímico.

Os métodos voltamétricos utilizados no estudo das caveolinas adsorvidas na superfície do GCE revelaram-se ferramentas muito úteis que permitiram obter informações relevantes, não só em relação à sua oxidação, como também permitiram analisar as alterações conformacionais resultantes das interações com o colesterol.

O estudo redox de proteínas com base no comportamento eletroquímico dos seus aminoácidos eletroativos abre caminho para o estudo de novas proteínas e para o desenvolvimento de novos biossensores.

CAPÍTULO 8

Conclusões

O objetivo do trabalho desenvolvido foi a investigação dos mecanismos de oxidação e redução de derivados da isatina e de proteínas membranares calmodulina e caveolinas. Estes sistemas biológicos estão interligados, uma vez que a calmodulina, que desempenha um papel fundamental na sinalização e regulação dos canais de cálcio, também estabelece ligações com diferentes moléculas alvo, incluindo a isatina, modulando a sua função. Além disso, a calmodulina na sua forma agregada com o cálcio, intervém na libertação e ativação da enzima eNOS que interage com a caveolina 1 nas células endoteliais.

Na primeira parte deste trabalho, a investigação consistiu no estudo do comportamento eletroquímico da isatina e de trinta derivados da isatina, que apresentam um largo espectro farmacológico, e que foram agrupados em função do grupo substituinte ligado à isatina. Neste sentido foram realizadas experiências voltamétricas na superfície do eletrodo de carbono vítreo, usando voltametria cíclica, de impulso diferencial e de onda quadrada, e em eletrólitos inertes de diferentes pHs.

A isatina é uma molécula muito reativa, o que faz com que seja frequentemente utilizada como substrato na síntese de uma enorme variedade de derivados. Tanto a isatina, como os seus derivados, participam num elevado número de reações de síntese

orgânica, que levam ao desenvolvimento de moléculas com perfil farmacológico muito vasto e diversas aplicações clínicas, devido às suas propriedades antimicrobianas, anticancerígenas e anti-inflamatórias.

O primeiro grupo de compostos estudados é formado por seis derivados nitrogenados da isatina, que contêm na sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio, nomeadamente os grupos funcionais nitro, hidrazona, semicarbazona e tiosemicarbazona, ligados à estrutura anelar da isatina, que apresentam propriedades e mecanismos redox distintos, em comparação com o comportamento eletroquímico da isatina.

O mecanismo de oxidação da 5-nitroisatina ocorre de modo idêntico ao da isatina, e envolve dois processos de transferência de eletrão. No entanto, o mecanismo de redução da 5-nitroisatina é um processo que envolve duas transferências de eletrão irreversíveis, com a formação de um produto de redução eletroativo reversível. A constante de ionização da 5-nitroisatina foi determinada, $pK_a \sim 10$.

Os derivados da isatina com os grupos funcionais hidrazona e semicarbazona apresentam mecanismos de oxidação irreversíveis, dependentes do pH e controlados por adsorção. O processo de oxidação dos derivados hidrazona ocorre em duas etapas consecutivas, que envolvem a transferência de um eletrão e um próton, estando associadas à oxidação do grupo hidrazona ligado na posição C3 no anel benzénico da isatina, e envolvem a formação de produtos de oxidação eletroativos. Na segunda etapa ocorre a libertação de N_2 e é gerada isatina, que é posteriormente oxidada. A constante de ionização da isatina-3-hidrazona foi determinada, $pK_a \sim 9$. O processo de oxidação dos derivados semicarbazona da isatina envolve, na primeira etapa, a transferência de um eletrão e um próton, com a formação de um radical livre. Na segunda etapa, o

radical é oxidado e forma-se um carbocatião. Simultaneamente, o anel benzénico é oxidado e ocorre a formação de dois produtos eletroativos.

O mecanismo de redução dos derivados nitrogenados da isatina ocorre num único passo irreversível, tal como acontece com a isatina, e envolve um processo de transferência de eletrão dependente do pH. Os grupos hidrazona e semicarbazona favorecem o carácter dador de eletrões da isatina, enquanto o grupo nitro favorece o carácter de aceitador de eletrões da isatina.

O segundo grupo de compostos estudados é constituído por onze derivados halogenados da isatina, e nele estão incluídos todos os derivados que possuem um ou dois átomos de halogéneos ligados ao anel benzénico da isatina. A oxidação dos derivados halogenados da isatina ocorre em passos sucessivos no anel benzénico da isatina. No entanto, em cada um dos derivados foram observadas pequenas variações nos processos redox, tanto na intensidade de corrente como na posição dos picos. Estas variações estão associadas à natureza, ao número e à posição dos átomos de halogéneo no anel benzénico da isatina.

O processo de oxidação dos derivados mono-halogenados ocorre em três etapas distintas, com a ocorrência de três transferências de eletrão reversíveis e dependentes do pH. No primeiro passo, um eletrão é removido do anel benzénico da isatina, que depois sofre uma desprotonação e um ataque nucleofílico por parte da água. No segundo passo, ocorre a oxidação do grupo 7 (ou 4)-OH, produzido no primeiro passo, que dá origem aos derivados *para*-quinona e *orto*-quinona da isatina, que são oxidados reversivelmente. Em comparação com a isatina, foi observado que os derivados mono-halogenados, com os átomos de halogéneo ligados na posição C5 ou C7, aumentam o carácter dador de eletrões, enquanto os derivados com dois átomos de halogéneo, nas posições C5, C7, C4 e C6, diminuem o carácter dador de eletrões da isatina.

O mecanismo de redução do derivado 5-flúor-isatina envolve duas transferências de elétron dependentes do pH, a primeira reversível e a segunda irreversível. A constante de ionização da 5-flúor-isatina foi determinada, $pK_a \sim 9$.

Os derivados di-halogenados da isatina apresentam um processo de oxidação que envolve duas transferências de elétron reversíveis e dependentes do pH, com a formação de produtos de oxidação não eletroativos. Um desvio dos potenciais dos picos de oxidação foi observado, devido ao efeito de estabilização provocado pela presença do segundo átomo de halogéneo ligado ao anel benzénico, que dificulta a remoção de elétrons nos derivados di-halogenados.

O terceiro grupo de compostos estudados é constituído por treze derivados da isatina substituídos com os grupos morfolino, hidroximetil e metil, e as suas formas halogenadas, com os átomos de halogéneo Cl, F, Br e I na posição C5 do anel benzénico. Os resultados obtidos demonstraram que os grupos funcionais morfolino, hidroximetil e metil não influenciaram o comportamento eletroquímico da isatina, uma vez que o processo de oxidação destes compostos na superfície do eléctrodo de carbono vítreo envolve as duas transferências de elétron, características da oxidação da isatina. Os resultados da voltametria de impulso diferencial e onda quadrada realizados com o derivado 1-morfolinometil-isatina permitiram também observar transferências de elétron irreversíveis, resultantes da oxidação dos produtos de oxidação do derivado 1-morfolinometil-isatina formado na superfície do eléctrodo de carbono vítreo. O processo de redução dos derivados da isatina com os grupos morfolino, hidroximetil e metil halogenados, com átomos de halogéneo na posição C5, envolve uma transferência de elétron que está relacionada com a redução da ligação carbono-halogéneo. As pequenas diferenças observadas nos potenciais dos picos de oxidação e redução estão

relacionadas com as características da interação das moléculas na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Na segunda parte deste trabalho foram investigados os processos de oxidação das proteínas calmodulina e caveolinas 1, 2 e 3, com base na oxidação eletroquímica dos seus resíduos de aminoácidos eletroativos em contato com a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

A calmodulina é uma proteína muito importante na sinalização e regulação de vários canais dependentes de cálcio, e tem um papel fundamental no controlo de vários processos fisiológicos. A oxidação da calmodulina no estado nativo, em solução, envolve uma única transferência de eletrão, dependente do pH, que corresponde à oxidação dos dois resíduos de aminoácidos tirosina. Devido à sua posição na estrutura 3D da calmodulina no estado nativo não é possível detetar a oxidação dos resíduos de aminoácidos metionina e histidina.

A desnaturação da calmodulina foi estudada com um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme multicamada de calmodulina incubado em agentes desnaturantes, e observou-se que o potencial de oxidação da calmodulina se mantém inalterado após a desnaturação, mas ocorrem alterações significativas na corrente de oxidação. A ureia provocou o desdobramento da estrutura 3D da calmodulina que resultou num aumento da corrente. O SDS e o DTT também desdobraram a estrutura 3D da calmodulina mas ocorreu a adsorção indesejada de resíduos não eletroativos da calmodulina na superfície do eletrodo de carbono vítreo, que causa a diminuição da área do eletrodo disponível, e uma diminuição acentuada na corrente de oxidação. Com o TCEP observou-se uma nova transferência de eletrão, que corresponde à oxidação do resíduo de aminoácido histidina na cadeia da calmodulina.

Após a agregação de íons de cálcio, a calmodulina altera a sua conformação, da forma ApoCaM para a forma HoloCaM, que contém áreas que permitem a interação e a agregação de peptídeos, enzimas e proteínas, de diferentes formas e tamanhos, ativando-as de modo a exercerem a sua atividade através de mudanças bioquímicas e celulares. A interação da calmodulina com o cálcio foi estudada; a voltametria de impulso diferencial permitiu detetar alterações significativas na corrente e no potencial dos resíduos de aminoácidos tirosina, em função da concentração de íons de cálcio presentes no meio. Os espectros de espectroscopia de impedância eletroquímica obtidos no elétrodo de carbono vítreo modificado por calmodulina revelaram um aumento da resistência à transferência de carga. As alterações conformacionais provocadas pelo cálcio tornam a calmodulina mais flexível, e por isso foi observado um aumento da resistência à difusão, com o aumento da concentração de íons de cálcio. Usando a microbalança de cristal de quartzo, foi possível determinar e quantificar a agregação dos íons de Ca^{2+} na superfície do cristal de quartzo coberto com ouro e grafite modificada com calmodulina, correspondente à ligação de quatro íons de cálcio na calmodulina.

As caveolinas 1, 2 e 3 são proteínas membranares estruturais que fazem parte da estrutura das cavéolas, sendo a caveolina 1 a mais importante. Todas as caveolinas apresentam na sua estrutura vários resíduos de aminoácidos eletroativos. A oxidação das caveolinas 1 e 2 no estado nativo apresentam uma transferência de eletrão, correspondente à oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina, triptofano e cisteína. Contudo, não foram observados, para potenciais positivos mais elevados, outras transferências de eletrão, a segunda do resíduo de triptofano, da cisteína, da metionina e da histidina, o que indica que na conformação das caveolinas 1 e 2 a estrutura 3D não favorece o acesso dos resíduos destes aminoácidos à superfície do elétrodo de carbono vítreo e impede a ocorrência dos processos de oxidação.

A desnaturação da caveolina 2 com agentes químicos provocou o desdobramento da estrutura 3D, uma vez que se verificaram alterações significativas na corrente de oxidação. A ureia provocou um aumento de corrente. O SDS afetou a estrutura 3D mas devido à adsorção de resíduos não eletroativos da caveolina 2 na superfície do eletrodo de carbono vítreo, o mecanismo de oxidação foi dificultado. Após incubação com GuaHCl observou-se a ocorrência de uma nova uma transferência de electrão, devido à oxidação dos resíduos dos aminoácidos cisteína.

A caveolina 1 tem uma elevada afinidade com o colesterol. Entre as suas várias funções, a caveolina 1 liga os principais componentes da formação das cavéolas, o colesterol e esfingolípídios. A interação das caveolinas 1, 2 e 3 com o colesterol foi avaliada por voltametria de impulso diferencial. No eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de caveolina 1 registou-se a diminuição da corrente de oxidação dos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano, provocada pela interação da proteína com o colesterol, que leva a alterações na conformação estrutural da caveolina 1, e que se refletem no comportamento eletroquímico dos resíduos de aminoácidos eletroativos. A interação da caveolina 1 com o colesterol foi confirmada mas, como era de esperar, no eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de caveolinas 2 ou 3 não se verificaram alterações significativas no comportamento eletroquímico, após a interação com o colesterol.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que os métodos eletroquímicos são ferramentas fundamentais para a caracterização e determinação de mecanismos redox em moléculas de interesse biológico e farmacológico, e em proteínas. Os métodos eletroquímicos apresentam inúmeras vantagens, principalmente no que respeita à elevada sensibilidade, ao custo reduzido da análise evitando usar solventes orgânicos, a rapidez e a possibilidade de miniaturizar e transportar o

equipamento, o que em conjunto com outros métodos, possibilita o desenvolvimento de novas moléculas com potencial uso farmacológico, elevada eficácia e maior seletividade.

Os métodos eletroquímicos permitem investigar em tempo real os processos que ocorrem na superfície dos elétrodos e os mecanismos de transferências de eletrão de reações biológicas. Os dados eletroquímicos podem ser correlacionados com a estrutura e actividade da molécula e, deste modo, contribuem para explicar e clarificar os processos de interação que podem ocorrer *in vivo*.

A interação de proteínas com a superfície dos elétrodos é uma área de investigação fundamental, que associada a outras técnicas nomeadamente, espectroscopia de impedância eletroquímica, gravimetria, microscopia de força atómica, espectrofotometria ou cromatografia, e permite o desenvolvimento de novos biossensores e dispositivos médicos.

CAPÍTULO 9

Referências

- [1] Ministério da Saúde, DL nº 176/2006 de 30 de agosto, Diário Da República 1ª Série.176(2006)6297–6303.
<http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/D2D959FC-A937-4850-B0DC-B60E04F2108B/0/62976383.pdf>.
- [2] É.T.G. Cavalheiro, C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds, *Bioanal. Rev.* 4 (2012) 31–53. doi:10.1007/s12566-012-0027-8.
- [3] S.M.A. Jorge, A.D.R. Pontinha, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical redox behavior of omeprazole using a glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. 22 (2010) 625–631. doi:10.1002/elan.200900377.
- [4] A.D.R. Pontinha, S.M.A. Jorge, V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, Antineoplastic Drug Methotrexate Redox Mechanism Using a Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*. 24 (2012) 917–923. doi:10.1002/elan.201100558.
- [5] M. Ghalkhani, I.P.G. Fernandes, S.C.B. Oliveira, S. Shahrokhian, A.M. Oliveira-Brett, Anodic behavior of clioquinol at a glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*. 80 (2011) 175–181. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.10.001.
- [6] T.A. Enache, O. Fatibello-Filho, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical Behavior of Triflusal, Aspirin and their Metabolites at Glassy Carbon and Boron Doped Diamond Electrodes, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13 (2010) 569–577. <http://www1.ci.uc.pt/pessoal/anabrett/pdfs/PDF-2010/140-Triflusal-CCHTS.pdf> (accessed May 23, 2017).
- [7] M. Ghalkhani, I.P.G. Fernandes, S.C.B. Oliveira, S. Shahrokhian, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical Redox Behaviour of Temozolomide Using a Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*. 22 (2010) 2633–2640. doi:10.1002/elan.201000272.
- [8] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, In situ evaluation of chromium--DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1633–1641. doi:10.1007/s00216-010-4051-7.
- [9] H. Shirinzadeh, A. Didem Yılmaz, M. Gumustas, S. Suzen, S. Ozden, S.A. Ozkan, Electrochemical Behavior of Indole-3-Carboxaldehyde Isonicotinoyl Hydrazones: Discussion on Possible Biological Behavior, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13 (2010) 619–627.
- [10] A.D.R. Pontinha, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical oxidation of metolazone at a glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. 20 (2008) 2531–2536. doi:10.1002/elan.200804352.
- [11] R.J. Sundberg, Sundberg, R. J., Indole, in: *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2000. doi:10.1002/0471238961.0914041519211404.a01.

- [12] F.A. Carey, *Organic Chemistry*, 5th Editio, McGraw-Hill Companies, NY, 2003.
- [13] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced organic chemistry: Structure and mechanisms*, Springer Verlag, NY, 2007.
- [14] K.R.F. Somers, E.S. Kryachko, A. Ceulemans, Theoretical study of indole: Protonation, indolyl radical, tautomers of indole, and its interaction with water, *Chem. Phys.* 301 (2004) 61–79. doi:10.1016/j.chemphys.2004.02.010.
- [15] A. Cano, O. Alcaraz, M.B. Arnao, Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 33–37. doi:10.1007/s00216-003-1848-7.
- [16] V. Sharma, P. Kumar, D. Pathak, Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review, *J. Heterocycl. Chem.* 47 (2010) 491–502.
- [17] N. Shafakat Ali, B. Dar, V. Pradhan, M. Farooqui, Chemistry and Biology of Indoles and Indazoles: A Mini-Review, *Mini-Reviews Med. Chem.* 13 (2013) 1792–1800. doi:10.2174/1389557511313120009.
- [18] P. Rani, V.K. Srivastava, A. Kumar, Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 449–452. doi:10.1016/j.ejmech.2003.11.002.
- [19] M. a a Radwan, E.A. Ragab, N.M. Sabry, S.M. El-Shenawy, Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents., *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 3832–3841. doi:10.1016/j.bmc.2007.03.024.
- [20] H. Tilg, Cruciferous vegetables: prototypic anti-inflammatory food components, *Clin. Phytoscience.* 1 (2015) 10. doi:10.1186/s40816-015-0011-2.
- [21] F. Palluotto, F. Campagna, A. Carotti, M. Ferappi, A. Rosato, C. Vitali, Synthesis and antibacterial activity of pyridazino[4,3-b]indole-4-carboxylic acids carrying different substituents at N-2, *Farmaco.* 57 (2002) 63–69. doi:10.1016/S0014-827X(01)01173-9.
- [22] J.R. Weng, C.H. Tsai, S.K. Kulp, C.S. Chen, Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent, *Cancer Lett.* 262 (2008) 153–163. doi:10.1016/j.canlet.2008.01.033.
- [23] E. Nassar, Synthesis , (in vitro) Antitumor and Antimicrobial Activity of some Pyrazoline , Pyridine , and Pyrimidine Derivatives Linked to Indole Moiety, *J. Am. Sci.* 6 (2010) 338–347. <http://www.americanscience.org>.
- [24] M.I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, N.E. Campillo, J.A. Páez, G.C. González-Muñoz, P. Usán, E. García-Palomero, M.G. López, M. Villarroya, A.G. García, A. Martínez, M.I. Rodríguez-Franco, Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer’s disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties, *ChemMedChem.* 4 (2009) 828–841. doi:10.1002/cmdc.200800414.

- [25] S. Süzen, Antioxidant activities of synthetic indole derivatives and possible activity mechanisms, *Bioact. Heterocycles* **V.** (2007) 145–178. doi:10.1007/7081_2007_074.
- [26] D. Tan, R.J. Reiter, L.C. Manchester, M. Yan, M. El-Sawi, R.M. Sainz, J.C. Mayo, R. Kohen, M. Allegra, R. Hardeland, Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger., *Curr. Top. Med. Chem.* **2** (2002) 181–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899100> (accessed May 23, 2017).
- [27] V.C. Diculescu, S. Kumbhat, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical behaviour of isatin at a glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta.* **575** (2006) 190–197. doi:10.1016/j.aca.2006.05.091.
- [28] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanalysis.* **23** (2011) 1337–1344. doi:10.1002/elan.201000671.
- [29] Y. Yardim, M.E. Erez, Electrochemical Behavior and Electroanalytical Determination of Indole-3-Acetic Acid Phytohormone on a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis.* **23** (2011) 667–673. doi:10.1002/elan.201000551.
- [30] C.G. Nan, Z.Z. Feng, W.X. Li, D.J. Ping, C.H. Qin, Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin, *Anal. Chim. Acta.* **452** (2002) 245–254. doi:10.1016/S0003-2670(01)01470-2.
- [31] P.G. Keech, N.J. Bunce, Electrochemical oxidation of simple indoles at a PbO₂ anode, *J. Appl. Electrochem.* **33** (2003) 79–83. doi:10.1023/A:1022962530646.
- [32] G.S. Singh, Z.Y. Desta, Isatins as privileged molecules in design and synthesis of spiro-fused cyclic frameworks, *Chem. Rev.* **112** (2012) 6104–6155. doi:10.1021/cr300135y.
- [33] M.-G.A. Shvekhgeimer, Synthesis of heterocyclic compounds by the cyclization of isatin and its derivatives (review), *Chem. Heterocycl. Compd.* **32** (1996) 249–276. doi:10.1007/BF01169241.
- [34] S.J. Shuttleworth, D. Nasturica, C. Gervais, M.A. Siddiqui, R.F. Rando, N. Lee, Parallel synthesis of isatin-based serine protease inhibitors., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10** (2000) 2501–2504. doi:10.1016/S0960-894X(00)00523-0.
- [35] P. Pakravan, S. Kashanian, M.M. Khodaei, F.J. Harding, Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: From structure to activity, *Pharmacol. Reports.* **65** (2013) 313–335. doi:10.1016/S1734-1140(13)71007-7.
- [36] A. Medvedev, O. Bussygyna, N. Pyatakova, V. Glover, I. Severina, Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets, *Biochem. Pharmacol.* **63** (2002) 763–766. doi:10.1016/S0006-2952(01)00809-7.

- [37] P. Watkins, A. Clow, V. Glover, J. Halket, A. Przyborowska, M. Sandler, Isatin, regional distribution in rat brain and tissues, *Neurochem. Int.* 17 (1990) 321–323. doi:10.1016/0197-0186(90)90154-L.
- [38] J.F.M. Da Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, The Chemistry of Isatins: A Review from 1975 to 1999, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 273–324. doi:10.1590/S0103-50532001000300002.
- [39] S.N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S.K. Sridhar, Biological activities of isatin and its derivatives., *Acta Pharm.* 55 (2005) 27–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907222>.
- [40] V. Glover, J.M. Halket, P.J. Watkins, A. Clow, B.L. Goodwin, M. Sandier, Isatin: Identity with the Purified Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitor Tribulin, *J. Neurochem.* 51 (1988) 656–659. doi:10.1111/j.1471-4159.1988.tb01089.x.
- [41] V. Glover, M.A. Reveley, M. Sandler, A monoamine oxidase inhibitor in human urine, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 467–470. doi:10.1016/0006-2952(80)90534-1.
- [42] V. Glover, S.K.B.H. Attach, A. Rya, The psychopharmacology of isatin: A brief review, in: *Stress Med.*, John Wiley & Sons, Ltd., 1998: pp. 225–229. doi:10.1002/(SICI)1099-1700(1998100)14:4<225::AID-SMI801>3.0.CO;2-P.
- [43] A.E. Medvedev, A. Clow, M. Sandler, V. Glover, Isatin: A link between natriuretic peptides and monoamines?, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 385–391. doi:10.1016/0006-2952(96)00206-7.
- [44] A.E. Medvedev, O.A. Buneeva, A.T. Kopylov, O. V. Gnedenko, M. V. Medvedeva, S.A. Kozin, A.S. Ivanov, V.G. Zgoda, A.A. Makarov, The effects of endogenous non-peptide molecule Isatin and hydrogen peroxide on proteomic profiling of rat brain amyloid-?? binding proteins: Relevance to Alzheimer??s disease?, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 476–495. doi:10.3390/ijms16010476.
- [45] G. Farnia, G. Capobianco, A. Romanin, Polarographic behaviour of isatin and some of its derivatives in DMF, *J. Electroanal. Chem.* 45 (1973) 397–404. doi:10.1016/S0022-0728(73)80049-X.
- [46] A.K. Gupta, R.S. Sindal, A comparative study of electrochemical reduction of isatin and its synthesized Schiff bases at HMDE, *J. Chem. Sci.* 121 (2009) 347–351. doi:10.1007/s12039-009-0040-9.
- [47] H. Adibi, M.M. Khodaei, P. Pakravan, R. Abiri, Synthesis, characterization, and in Vitro antimicrobial evaluation of hydrazone and bishydrazone derivatives of isatin, *Pharm. Chem. J.* 44 (2010) 219–227. doi:10.1007/s11094-010-0436-3.
- [48] V. Eggadi, U. Kulandaivelu, S.B.B. Sheshagiri, V. Rao Jupalli, Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer activity of Thiazole Tagged Isatin Hydrazones, *J. Pharm. Chem.* 3 (2016) 4. doi:10.14805/jphchem.2016.art52.

- [49] S.K. Sridhar, S.N. Pandeya, J.P. Stables, A. Ramesh, Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 129–132. doi:10.1016/S0928-0987(02)00077-5.
- [50] M. Singh, N. Raghav, Biological activities of hydrazones: A review, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 26–32. doi:10.1186/1752-153X-5-2; Rollas, S., Kiiciikguzel, S.G., Biological Activities of Hydrazone Derivatives (2007) *Molecules*, 12, pp. 1910-1939; Yadav, J., Pandeya, S.N., Nath, G., Singh, S.P., Synthesis and antibacterial evaluation of some hydrazones of flavanoid derivatives (2010) *J Chem Pharm Res*, 2 (4), pp. 558-563; Khan, S.U., Mullick, P., Pandit, S., Kaushik, D., Synthesis of hydrazones derivatives of Quinoxaline-prospective antimicrobial and anti-inflammatory agents (2009) *Acta Polonica Pharmac.*
- [51] S. Rollas, Ş.G. Küçükğüzel, Biological activities of hydrazone derivatives, *Molecules*. 12 (2007) 1910–1939. doi:10.3390/12081910.
- [52] M.C. Rodríguez-Argüelles, M.B. Ferrari, F. Bisceglie, C. Pelizzi, G. Pelosi, S. Pinelli, M. Sassi, Synthesis, characterization and biological activity of Ni, Cu and Zn complexes of isatin hydrazones, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 313–321. doi:10.1016/j.jinorgbio.2003.10.006.
- [53] F. Campagna, M. Catto, R. Purgatorio, C.D. Altomare, A. Carotti, A. De Stradis, G. Palazzo, Synthesis and biophysical evaluation of arylhydrazono-1H-2-indolinones as β -amyloid aggregation inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 275–284. doi:10.1016/j.ejmech.2010.11.015.
- [54] H. Beraldo, Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos, in: *Quim. Nova, SBQ*, 2004: pp. 461–471. doi:10.1590/S0100-40422004000300017.
- [55] R.P. Tenório, A.J.S. Góes, J.G. De Lima, A.R. De Faria, A.J. Alves, T.M. De Aquino, Tiosemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica, *Quim. Nova*. 28 (2005) 1030–1037. doi:10.1590/S0100-40422005000600018.
- [56] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P. V. Bernhardt, D.R. Richardson, Thiosemicarbazones from the old to new: Iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5271–5294. doi:10.1021/jm900552r.
- [57] N. Moorthy, N. Cerqueira, M. Ramos, P. Fernandes, Development of Ribonucleotide Reductase Inhibitors: A Review on Structure Activity Relationships, *Mini Rev Med Chem.* 13 (2013) 1862–1872. doi:http://dx.doi.org/10.2174/13895575113136660090.
- [58] M.D. Hall, N.K. Salam, J.L. Hellawell, H.M. Fales, C.B. Kensler, J.A. Ludwig, G. Szakács, D.E. Hibbs, M.M. Gottesman, Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin- β - thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 3191–3204.

doi:10.1021/jm800861c.

- [59] S.N. Pandeya, J.R. Dimmock, Recent evaluations of thiosemicarbazones and semicarbazones and related compounds for antineoplastic and anticonvulsant activities, *Pharmazie*. 48 (1993) 659–666. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234398> (accessed May 24, 2017).
- [60] S.S. Karki, S. Thota, S.Y. Darj, J. Balzarini, E. De Clercq, Synthesis, anticancer, and cytotoxic activities of some mononuclear Ru(II) compounds, *Bioorganic Med. Chem.* 15 (2007) 6632–6641. doi:10.1016/j.bmc.2007.08.014.
- [61] L.M. Finkielstein, E.F. Castro, L.E. Fabián, G.Y. Moltrasio, R.H. Campos, L. V. Cavallaro, A.G. Moglioni, New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1767–1773. doi:10.1016/j.ejmech.2007.10.023.
- [62] N. Karali, A. Gürsoy, F. Kandemirli, N. Shvets, F.B. Kaynak, S. Özbey, V. Kovalishyn, A. Dimoglo, Synthesis and structure-antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives, *Bioorganic Med. Chem.* 15 (2007) 5888–5904. doi:10.1016/j.bmc.2007.05.063.
- [63] T.R. Bal, B. Anand, P. Yogeeswari, D. Sriram, Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin β -thiosemicarbazone derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 4451–4455. doi:10.1016/j.bmcl.2005.07.046.
- [64] K.L. Vine, J.M. Locke, M. Ranson, K. Benkendorff, S.G. Pyne, J.B. Bremner, In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives, *Bioorganic Med. Chem.* 15 (2007) 931–938. doi:10.1016/j.bmc.2006.10.035.
- [65] K. Vine, L. Matesic, J. Locke, M. Ranson, D. Skropeta, Cytotoxic and Anticancer Activities of Isatin and Its Derivatives: A Comprehensive Review from 2000-2008, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 9 (2009) 397–414. doi:10.2174/1871520610909040397.
- [66] A. González, J. Quirante, J. Nieto, M.R. Almeida, M.J. Saraiva, A. Planas, G. Arsequell, G. Valencia, Isatin derivatives, a novel class of transthyretin fibrillogenesis inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5270–5273. doi:10.1016/j.bmcl.2009.03.004.
- [67] P. Naumov, F. Anastasova, Experimental and theoretical vibrational study of isatin, its 5-(NO₂, F, Cl, Br, I, CH₃) analogues and the isatinato anion, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 469–481. doi:10.1016/S1386-1425(00)00393-0.
- [68] G. Cerchiaro, A.M.D.C. Ferreira, Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potential pharmacological agents, in: *J. Braz. Chem. Soc.*, 2006: pp. 1473–1485. doi:10.1590/S0103-50532006000800003.
- [69] A. Jarrahpour, D. Khalili, E. De Clercq, C. Salmi, J.M. Brunel, Synthesis, antibacterial, antifungal and antiviral activity evaluation of some new bis-Schiff bases of isatin and their derivatives, *Molecules.* 12 (2007) 1720–1730. doi:10.3390/12081720.

- [70] C.R. Prakash, S. Raja, Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of some novel 5-substituted Schiff and Mannich base of isatin derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.* 17 (2013) 337–344. doi:10.1016/j.jscs.2011.10.022.
- [71] T. Aboul-Fadl, F.A.S. Bin-Jubair, O. Aboul-Wafa, Schiff bases of indoline-2,3-dione (isatin) derivatives and nalidixic acid carbohydrazide, synthesis, antitubercular activity and pharmacophoric model building, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4578–4586. doi:10.1016/j.ejmech.2010.07.020.
- [72] R. Sabet, M. Mohammadpour, A. Sadeghi, A. Fassihi, QSAR study of isatin analogues as in vitro anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1113–1118. doi:10.1016/j.ejmech.2009.12.010.
- [73] R. Roskoski, Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 323–328. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.156.
- [74] E. Raymond, P. Hammel, C. Dreyer, C. Maatescu, O. Hentic, P. Ruzsniowski, S. Faivre, Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors, *Target. Oncol.* 7 (2012) 117–125. doi:10.1007/s11523-012-0220-2.
- [75] S. Faivre, G. Demetri, W. Sargent, E. Raymond, Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 734–745. doi:10.1038/nrd2380.
- [76] L.Q.M. Chow, S.G. Eckhardt, Sunitinib: From rational design to clinical efficacy, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 884–896. doi:10.1200/JCO.2006.06.3602.
- [77] S. Shah, C. Lee, H. Choi, J. Gautam, H. Jang, G.J. Kim, Y.-J. Lee, C.L. Chaudhary, S.W. Park, T. Nam, J.-A. Kim, B.-S. Jeong, 5-Hydroxy-7-azaindolin-2-one, a novel hybrid of pyridinol and sunitinib: design, synthesis and cytotoxicity against cancer cells, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 4829–4841. doi:10.1039/C6OB00406G.
- [78] T. Aboul-Fadl, F.A.S. Bin-Jubair, Anti-tubercular activity of isatin derivatives, *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 1 (2010) 113–126.
- [79] C. Xie, L.-M. Tang, F.-N. Li, L.-P. Guan, C.-Y. Pan, S.-H. Wang, Structure-based design, synthesis, and anticonvulsant activity of isatin-1-N-phenylacetamide derivatives, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 2161–2168. doi:10.1007/s00044-013-0811-1.
- [80] D. Sriram, P. Yogeewari, J.S. Basha, D.R. Radha, V. Nagaraja, Synthesis and antimycobacterial evaluation of various 7-substituted ciprofloxacin derivatives, *Bioorganic Med. Chem.* 13 (2005) 5774–5778. doi:10.1016/j.bmc.2005.05.063.
- [81] M. Verma, S.N. Pandeya, K.N. Singh, J.P. Stables, Anticonvulsant activity of Schiff bases of isatin derivatives., *Acta Pharm.* 54 (2004) 49–56.
- [82] S.N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath, E. De Clercq, Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine,

II Farm. 54 (1999) 624–628. doi:10.1016/S0014-827X(99)00075-0.

- [83] M. Al-Ghorbani, A. Bushra Begum, Z. Zabiulla, S. V. Mamatha, S.A. Khanum, Piperazine and morpholine: Synthetic preview and pharmaceutical applications, *Res. J. Pharm. Technol.* 8 (2015) 611–628. doi:10.5958/0974-360X.2015.00100.6.
- [84] S.S. Chhajed, M.S. Padwal, Antimicrobial evaluation of some novel Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with quinolin, *Int. J. ChemTech Res.* 2 (2010) 209–213.
- [85] K.R. Senwar, P. Sharma, T.S. Reddy, M.K. Jeengar, V.L. Nayak, V.G.M. Naidu, A. Kamal, N. Shankaraiah, Spirooxindole-derived morpholine-fused-1,2,3-triazoles: Design, synthesis, cytotoxicity and apoptosis inducing studies, *Eur. J. Med. Chem.* 102 (2015) 413–424. doi:10.1016/j.ejmech.2015.08.017.
- [86] A.J. Abdulghani, N.M. Abbas, Synthesis characterization and biological activity study of new Schiff and Mannich bases and some metal complexes derived from isatin and dithiooxamide, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2011 (2011). doi:10.1155/2011/706262.
- [87] J. Summerton, Morpholino, siRNA, and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity, *Curr. Top. Med. Chem.* 7 (2007) 651–660. doi:10.2174/156802607780487740.
- [88] D. Martins, R. Levicky, Y.A. Song, Enhancing the speed of morpholino-DNA biosensor by electrokinetic concentration of DNA in a microfluidic chip, *Biosens. Bioelectron.* 72 (2015) 87–94. doi:10.1016/j.bios.2015.04.063.
- [89] P. Gong, K. Wang, Y. Liu, Molecular Mechanisms in Morpholino-DNA Surface Hybridization, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9663–9671. doi:10.1016/j.bios.2010.04.001.(7).
- [90] Y. Liu, D. Irving, W. Qiao, D. Ge, R. Levicky, Kinetic Mechanisms in Morpholino in DNA Surface Hybridization, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11588–11596.
- [91] I.P.G. Fernandes, B. V. Silva, B.N.M. Silva, A. Pinto, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Isatin halogen-derivatives redox behaviour, *J. Electroanal. Chem.* 780 (2016) 75–83. doi:10.1016/j.jelechem.2016.09.008.
- [92] S.C.B. Oliveira, I.P.G. Fernandes, B. V. Silva, A.C. Pinto, A.M. Oliveira-Brett, Isatin nitro-derivatives redox behaviour, *J. Electroanal. Chem.* (2013). doi:10.1016/j.jelechem.2012.10.018.
- [93] I.P.G. Fernandes, B. V. Silva, B.N.M. Silva, A.C. Pinto, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1-methyl, and their halogenated derivatives, redox behaviour, *J. Electroanal. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.jelechem.2017.05.030.
- [94] D. Whitford, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, J. Wiley & Sons, West Sussex, England, 2005.

- [95] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*, 3rd editio, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.
- [96] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides Recommendations 1983, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 9–37. doi:10.1111/j.1399-3011.1984.tb00922.x.
- [97] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- [98] S.M. MacDonald, S.G. Roscoe, Electrochemical oxidation reactions of tyrosine, tryptophan and related dipeptides, *Electrochim. Acta.* 42 (1997) 1189–1200. doi:10.1016/S0013-4686(96)00285-X.
- [99] F. Huerta, E. Moralln, F. Cases, A. Rodes, J.L. V, A. Aldaz, Electrochemical behaviour of amino acids on Pt (h , k , l). A voltammetric and in situ FTIR study . Part II . Serine and alanine on Pt (111), *J. Electroanal. Chem.* 431 (1997) 269–275.
- [100] E. V. Suprun, S.A. Khmeleva, S.P. Radko, S.A. Kozin, A.I. Archakov, V. V. Shumyantseva, Direct electrochemical oxidation of amyloid- β peptides via tyrosine, histidine, and methionine residues, *Electrochem. Commun.* 65 (2016) 53–56. doi:10.1016/j.elecom.2016.02.004.
- [101] J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes. Part I. Sulfur components: Cystine, cysteine, methionine, *J. Electroanal. Chem.* 114 (1980) 195–211. doi:10.1016/S0022-0728(80)80447-5.
- [102] V. Brabec, V. Mornstein, Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids., *Biophys. Chem.* 12 (1980) 159–165. doi:10.1016/0301-4622(80)80048-2.
- [103] Y. Fan, J.H. Liu, H.T. Lu, Q. Zhang, Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film, *Microchim. Acta.* 173 (2011) 241–247. doi:10.1007/s00604-011-0556-9.
- [104] G.P. Jin, X.Q. Lin, The electrochemical behavior and amperometric determination of tyrosine and tryptophan at a glassy carbon electrode modified with butyrylcholine, *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 454–460. doi:10.1016/j.elecom.2004.03.006.
- [105] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9–16. doi:10.1016/j.jelechem.2011.02.022.
- [106] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry.* 89 (2013) 11–18. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.08.004.

- [107] B. Malfoy, J.A. Reynaud, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 114 (1980) 213–223. doi:10.1016/S0022-0728(80)80448-7.
- [108] L.C. Chen, C.C. Chang, H.C. Chang, Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 2883–2889. doi:10.1016/j.electacta.2007.10.071.
- [109] S. Fei, J. Chen, S. Yao, G. Deng, D. He, Y. Kuang, Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum, *Anal. Biochem.* 339 (2005) 29–35. doi:10.1016/j.ab.2005.01.002.
- [110] M. Zhou, J. Ding, L.P. Guo, Q.K. Shang, Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5328–5335. doi:10.1021/ac0703707.
- [111] M. Gómez-Mingot, J. Iniesta, V. Montiel, R.O. Kadara, C.E. Banks, Direct oxidation of methionine at screen printed graphite macroelectrodes: Towards rapid sensing platforms, *Sensors Actuators, B Chem.* 155 (2011) 831–836. doi:10.1016/j.snb.2011.01.056.
- [112] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry.* 81 (2011) 46–52. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.02.001.
- [113] National Human Genome Research Institute (NHGRI), (n.d.). <https://www.genome.gov/> (accessed May 24, 2017).
- [114] Protein Data Bank, (n.d.). <https://www.wwpdb.org/>.
- [115] E.R. STADTMAN, R.L. LEVINE, Protein Oxidation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2006) 191–208. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x.
- [116] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [117] I. FRIDOVICH, Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893 (1999) 13–18. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x.
- [118] A. Kunwar, K.. Priyadarsini, Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health, *J. Med. Allied Sci.* 1 (2011) 53–60. doi:10.1007/s11746-998-0032-9.
- [119] S. Barelli, G. Canellini, L. Thadikaran, D. Crettaz, M. Quadroni, J.S. Rossier, J.D. Tissot, N. Lion, Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics, *Proteomics - Clin. Appl.* 2 (2008) 142–157. doi:10.1002/prca.200780009.

- [120] B. Bs, S. Er, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J Biol Chem.* 272 (1997) 20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313.
- [121] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids.* 25 (2003) 207–218. doi:10.1007/s00726-003-0011-2.
- [122] D. Tp, T. Jc, B. Kk, S. Ks, G. Ss, L. Rd, Free radicals and antioxidants in human health : current status and future prospects . *PubMed Commons*, (2015) 1–2.
- [123] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing., *Nature.* 408 (2000) 239–247. doi:10.1038/35041687.
- [124] a Vesela, J. Wilhelm, The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism, *Physiol. Res.* 51 (2002) 335–339. isi:000179140300002.
- [125] O. Aruoma, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 199–212. doi:10.1007/s11746-998-0032-9.
- [126] J.M.C. GUTTERIDGE, B. HALLIWELL, Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2006) 136–147. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
- [127] R.L. Levine, B.S. Berlett, J. Moskowitz, L. Mosoni, E.R. Stadtman, Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage, *Mech. Ageing Dev.* 107 (1999) 323–332. doi:10.1016/S0047-6374(98)00152-3.
- [128] W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 93–105. doi:10.1016/0891-5849(94)00158-G.
- [129] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42 (2003) 4742–4758. doi:10.1002/anie.200300573.
- [130] E.R. Stadtman, J. Moskowitz, B.S. Berlett, R.L. Levine, Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism, *Mol. Cell. Biochem.* 234–235 (2002) 3–9. doi:10.1023/A:1015916831583.
- [131] S. Štolc, Indole derivatives as neuroprotectants, in: *Life Sci.*, 1999: pp. 1943–1950. doi:10.1016/S0024-3205(99)00453-1.
- [132] T. Hoshi, S. Heinemann, Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction., *J. Physiol.* 531 (2001) 1–11. doi:PHY_1846 [pii].
- [133] M. Baghayeri, E.N. Zare, M. Namadchian, Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on biocompatible poly(styrene-alternative-maleic acid)/functionalized multi-wall carbon nanotubes blends, *Sensors Actuators, B Chem.* 188 (2013) 227–234. doi:10.1016/j.snb.2013.07.028.

- [134] E. V. Suprun, V. V. Shumyantseva, A.I. Archakov, Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review, *Electrochim. Acta.* 140 (2014) 72–82. doi:10.1016/j.electacta.2014.03.089.
- [135] J.E. FREW, H.A.O. HILL, Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins, *Eur. J. Biochem.* 172 (1988) 261–269. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13882.x.
- [136] J.J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, D.B. Hibbert, Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9006–9007. doi:10.1021/ja035722f.
- [137] B. V. Chikkaveeraiah, A. Bhirde, N.Y. Morgan, E.H. S., Xiaoyuan chen, Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers, *ACS Nano.* 6 (2012) 6546–6561. doi:10.1021/nl061786n.Core-Shell.
- [138] D. Chan, M.M. Barsan, Y. Korpan, C.M. Brett, M. MBarsan, Title: L-lactate selective impedimetric bienzymatic biosensor based on lactate dehydrogenase and pyruvate oxidase, *Electrochim. Acta.* (2017). doi:10.1016/j.electacta.2017.02.050.
- [139] M. Braik, M.M. Barsan, C. Dridi, B. Ali, C.M.A. Brett, Highly sensitive amperometric enzyme biosensor for detection of superoxide based on conducting polymer/CNT modified electrodes and superoxide dismutase, *Sensors Actuators B.* 236 (2016) 574–582. doi:10.1016/j.snb.2016.06.032.
- [140] A. Attar, M.E. Ghica, A. Amine, C.M.A. Brett, Analytical Letters Comparison of Cobalt Hexacyanoferrate and Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes for the Amperometric Detection of Heavy Metals Based on Glucose Oxidase Enzyme Inhibition Comparison of Cobalt Hexacyanoferrate and Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes for the Amperometric Detection of Heavy Metals Based on Glucose Oxidase Enzyme Inhibition, *Anal. Lett.* 484 (2015) 659–671. doi:10.1080/00032719.2014.952372.
- [141] M.E. Ghica, R. Pauliukaite, O. Fatibello-Filho, C.M.A. Brett, Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors, *Sensors Actuators, B Chem.* 142 (2009) 308–315. doi:10.1016/j.snb.2009.08.012.
- [142] M. Florescu, C.M. A Brett, Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes., *Talanta.* 65 (2005) 306–12. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.003.
- [143] B. Dinesh, V. Mani, R. Saraswathi, S.-M. Chen, Direct electrochemistry of cytochrome c immobilized on a graphene oxide–carbon nanotube composite for picomolar detection of hydrogen peroxide, *RSC Adv.* 4 (2014) 28229. doi:10.1039/c4ra02789b.
- [144] C. Xiang, Y. Zou, S. Qiu, L. Sun, F. Xu, H. Zhou, Bienzymatic glucose biosensor based on direct electrochemistry of cytochrome c on gold nanoparticles/polyaniline nanospheres composite, *Talanta.* 110 (2013) 96–100.

doi:10.1016/j.talanta.2013.02.022.

- [145] M. Falk, Z. Blum, S. Shleev, Direct electron transfer based enzymatic fuel cells, *Electrochim. Acta.* 82 (2012) 191–202. doi:10.1016/j.electacta.2011.12.133.
- [146] M.U. Ahmed, M.M. Hossain, E. Tamiya, Electrochemical biosensors for medical and food applications, *Electroanalysis.* 20 (2008) 616–626. doi:10.1002/elan.200704121.
- [147] S.C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem. Rev.* 104 (2004) 4867–4886. doi:10.1021/cr020719k.
- [148] S. Palanisamy, C. Karuppiah, S.M. Chen, Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 114 (2014) 164–169. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.10.006.
- [149] N. Hu, Direct electrochemistry of redox proteins or enzymes at various film electrodes and their possible applications in monitoring some pollutants, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1979–1991. doi:10.1351/pac200173121979.
- [150] Michael V. Mirkin, S. Amemiya, *Nanoelectrochemistry*, Taylor & Francis group, New York, 2015. <https://books.google.pt/books?id=uEu3BgAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.
- [151] P. Si, S. Ding, J. Yuan, X.W. Lou, D.H. Kim, Hierarchically structured one-dimensional TiO₂ for protein immobilization, direct electrochemistry, and mediator-free glucose sensing, *ACS Nano.* 5 (2011) 7617–7626. doi:10.1021/nn202714c.
- [152] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review, *Sensors (Basel).* 13 (2013) 4811–4840. doi:10.3390/s130404811.
- [153] R.S. Freire, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota, Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 230–243. doi:10.1590/S0103-50532003000200008.
- [154] M. Lou Fultz, R.A. Durst, Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation, *Anal. Chim. Acta.* 140 (1982) 1–18. doi:10.1016/S0003-2670(01)95447-9.
- [155] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, *Anal. Chim. Acta.* 400 (1999) 91–108. doi:10.1016/S0003-2670(99)00610-8.
- [156] F.N. Crespilho, V. Zucolotto, C.M.A. Brett, O.N. Oliveira, F.C. Nart, Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B.* 110

- (2006) 17478–17483. doi:10.1021/jp062098v.
- [157] F.A. Armstrong, A.O. Hill, N.J. Walton, Direct electrochemistry of redox proteins, *Acc. Chem. Res.* 21 (1988) 407–413. doi:10.1021/ar00155a004.
- [158] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [159] F. HOOK, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 12271–12276. doi:10.1073/pnas.95.21.12271.
- [160] V. Hlady, J. Buijs, Protein adsorption on solid surfaces., *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 72–7. doi:10.1016/S0958-1669(96)80098-X.
- [161] V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, E. V. Suprun, A. V. Kuzikov, L.E. Agafonova, A.I. Archakov, Electrochemical methods in biomedical studies, *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 9 (2015) 228–243. doi:10.1134/S1990750815030087.
- [162] A. Salimi, L. Mohamadi, R. Hallaj, S. Soltanian, Electrooxidation of insulin at silicon carbide nanoparticles modified glassy carbon electrode, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 1116–1119. doi:10.1016/j.elecom.2009.03.024.
- [163] A.A. Karyakin, Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis, *Bioelectrochemistry.* 88 (2012) 70–75. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.05.001.
- [164] C. Gao, Z. Guo, J.-H. Liu, X.-J. Huang, The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors, *Nanoscale.* 4 (2012) 1948. doi:10.1039/c2nr11757f.
- [165] W.R. HAGEN, Direct electron transfer of redox proteins at the bare glassy carbon electrode, *Eur. J. Biochem.* 182 (1989) 523–530. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14859.x.
- [166] A. Guiseppi-Elie, C. Lei, R.H. Baughman, Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes, *Nanotechnology.* 13 (2002) 559–564. doi:10.1088/0957-4484/13/5/303.
- [167] E. Topoglidis, Y. Astuti, F. Duriaux, M. Grtzel, J.R. Durrant, M. Gra, Direct Electrochemistry and Nitric Oxide Interaction of Heme Proteins Adsorbed on Nanocrystalline Tin Oxide Electrodes Direct Electrochemistry and Nitric Oxide Interaction of Heme Proteins Adsorbed on Nanocrystalline Tin Oxide Electrodes, 8 (2003) 6894–6900. doi:10.1021/la034466h.
- [168] E. Paleček, J. Tkáč, M. Bartošík, T. Bertók, V. Ostatná, J. Paleček, Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics, *Chem. Rev.* 115 (2015) 2045–2108. doi:10.1021/cr500279h.

- [169] A. Salimi, E. Sharifi, A. Noorbakhsh, S. Soltanian, Direct voltammetry and electrocatalytic properties of hemoglobin immobilized on a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1499–1508. doi:10.1016/j.elecom.2006.06.017.
- [170] V. Ostatná, H. Černocká, K. Kurzatowska, E. Paleček, Native and denatured forms of proteins can be discriminated at edge plane carbon electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 735 (2012) 31–36. doi:10.1016/j.aca.2012.05.012.
- [171] M. Zhang, C. Mullens, W. Gorski, Insulin oxidation and determination at carbon electrodes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6396–6401. doi:10.1021/ac0508752.
- [172] M. Tomschik, L. Havran, M. Fojta, E. Paleček, Constant Current Chronopotentiometric Stripping Analysis of Bioactive Peptides at Mercury and Carbon Electrodes, *Electroanalysis.* 10 (1998) 403–409. doi:10.1002/(SICI)1521-4109(199805)10:6<403::AID-ELAN403>3.0.CO;2-2.
- [173] J. Petřlova, M. Masarik, D. Potesil, V. Adam, L. Trnkova, R. Kizek, Zeptomole detection of streptavidin using carbon paste electrode and square-wave voltammetry, *Electroanalysis.* 19 (2007) 1177–1182. doi:10.1002/elan.200603837.
- [174] V. Brabec, V. Mornstein, Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions, *Biochim. Biophys. Acta.* 625 (1980) 43–50. doi:10.1016/0005-2795(80)90106-3.
- [175] J. Vacek, J. Vrba, M. Zatloukalová, M. Kubala, Electrochemical oxidation of proteins using ionic liquids as solubilizers, adsorption solvents and electrolytes, *Electrochim. Acta.* 126 (2014) 31–36. doi:10.1016/j.electacta.2013.06.115.
- [176] M. Ishizaki, Y. Oka, Amperometric recording of gonadotropin-releasing hormone release activity in the pituitary of the dwarf gourami (teleost) brain-pituitary slices, *Neurosci. Lett.* 299 (2001) 121–124. doi:10.1016/S0304-3940(01)01492-6.
- [177] M. Chiku, T.A. Ivandini, A. Kamiya, A. Fujishima, Y. Einaga, Direct electrochemical oxidation of proteins at conductive diamond electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 612 (2008) 201–207. doi:10.1016/j.jelechem.2007.09.027.
- [178] E. V. Suprun, S.P. Radko, S.A. Khmeleva, V.A. Mitkevich, A.I. Archakov, A.A. Makarov, V. V. Shumyantseva, Electrochemical oxidation of amyloid-beta peptide isoforms on carbon screen printed electrodes, *Electrochem. Commun.* 75 (2017) 33–37. doi:10.1016/j.elecom.2016.12.009.
- [179] W.M. Eldehna, M. Fares, M. Ceruso, H.A. Ghabbour, S.M. Abou-Seri, H.A. Abdel-Aziz, D.A. Abou El Ella, C.T. Supuran, Amido/ureidosubstituted benzenesulfonamides-isatin conjugates as low nanomolar/subnanomolar inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform XII, *Eur. J. Med. Chem.* 110 (2016) 259–266. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.030.

- [180] E. V. Suprun, M.S. Zharkova, G.E. Morozevich, A. V. Veselovsky, V. V. Shumyantseva, A.I. Archakov, Analysis of redox activity of proteins on the carbon screen printed electrodes, *Electroanalysis*. 25 (2013) 2109–2116. doi:10.1002/elan.201300248.
- [181] O. Buneeva, O. Gnedenko, V. Zgoda, A. Kopylov, V. Glover, A. Ivanov, A. Medvedev, A. Archakov, Isatin-binding proteins of rat and mouse brain: Proteomic identification and optical biosensor validation, *Proteomics*. 10 (2010) 23–37. doi:10.1002/pmic.200900492.
- [182] O. a Buneeva, a T. Kopylov, O. V Tikhonova, V.G. Zgoda, a E. Medvedev, a I. Archakov, Effect of affinity sorbent on proteomic profiling of isatin-binding proteins of mouse brain., *Biochem. Biokhimiia*. 77 (2012) 1326–38. doi:10.1134/S0006297912110120.
- [183] D. Chin, A.R. Means, Calmodulin: A prototypical calcium sensor, *Trends Cell Biol*. 10 (2000) 322–328. doi:10.1016/S0962-8924(00)01800-6.
- [184] M.W. Berchtold, A. Villalobo, The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 1843 (2014) 398–435. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.021.
- [185] L.A. Jurado, P.S. Chockalingam, H.W. Jarrett, Apocalmodulin, *Physiol. Res*. 79 (1999) 661–682.
- [186] Y.S. Babu, C.E. Bugg, W.J. Cook, Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol*. 204 (1988) 191–204. doi:10.1016/0022-2836(88)90608-0.
- [187] A. Lewit-Bentley, S. Réty, EF-Hand Calcium-Binding Proteins., *Curr. Opin. Struct. Biol*. 10 (2000) 637–643.
- [188] G. Gibrat, L. Assairi, C.T. Craescu, G. Hui Bon Hoa, D. Loew, B. Lombard, L. Blouquit, M.C. Bellissent-Funel, Use of SANS and biophysical techniques to reveal subtle conformational differences between native apo-calmodulin and its unfolded states, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1824 (2012) 1097–1106. doi:10.1016/j.bbapap.2012.06.001.
- [189] H. Tidow, P. Nissen, Structural diversity of calmodulin binding to its target sites, *FEBS J*. 280 (2013) 5551–5565. doi:10.1111/febs.12296.
- [190] P.W. Shaul, E.J. Smart, L.J. Robinson, Z. German, I.S. Yuhanna, R.G.W. Anderson, T. Michel, Acylation targets emdotheil nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae Acylation Targets Endothelial Nitric-oxide Synthase to, *J. Biol. Chem*. 271 (1996) 6518–6522.
- [191] D. Fulton, J. Gratton, W.C. Sessa, Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase : Why Isn ' t Calcium / Calmodulin Enough ?, *Perpectives Pharmacol*. 299 (2001) 818–824.
- [192] M.A. Marletta, Nitric Oxide Synthase : Aspects Concerning Structure and Catalysis, *Cell*. 78 (1994) 927–930.

- [193] F.L.M. Ricciardolo, Multiple roles of nitric oxide in the airways, *Thorax*. 58 (2003) 175–182. doi:10.1136/thorax.58.2.175.
- [194] J.R. Geiser, D. van Tuinen, S.E. Brockerhoff, M.M. Neff, T.N. Davis, Can calmodulin function without binding calcium?, *Cell*. 65 (1991) 949–959. doi:10.1016/0092-8674(91)90547-C.
- [195] C.R. Kahl, A.R. Means, Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 719–736. doi:10.1210/er.2003-0008.
- [196] J.S. Shim, J. Lee, K.N. Kim, H.J. Kwon, Development of a new Ca²⁺/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 747–751. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.174.
- [197] J. Wei, H.P. Morris, R.A. Hickie, Positive Correlation between Calmodulin Content and Hepatoma Growth Rates Positive Correlation between Calmodulin Content and Hepatoma Growth Rates, *Cancer Res.* 42 (1982) 2571–2574.
- [198] R. Nussinov, S. Muratcioglu, C.-J. Tsai, H. Jang, A. Gursoy, O. Keskin, The Key Role of Calmodulin in KRAS-Driven Adenocarcinomas, *Mol. Cancer Res.* 13 (2015) 1265–1273. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0165.
- [199] F. Miyajima, Adolescent idiopathic scoliosis: current perspectives, *Orthop. Res. Rev.* Volume 6 (2014) 17. doi:10.2147/ORR.S37321.
- [200] T. Lowe, D. Lawellin, D. Smith, C. Price, T. Maher, A. Merola, M. O'Brien, Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity?., *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 27 (2002) 768–775. doi:10.1097/01.BRS.0000076833.90387.E0.
- [201] N. Esteras, C. Alquezar, A. de la Encarnacion, A. Villarejo, F. Bermejo-Pareja, A. Martin-Requero, Calmodulin levels in blood cells as a potential biomarker of Alzheimer's disease., *Alzheimers. Res. Ther.* 5 (2013) 55. doi:10.1186/alzrt219.
- [202] D.H. O'Day, K. Eshak, M.A. Myre, Calmodulin binding proteins and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 46 (2015) 553–569. doi:10.3233/JAD-142772.
- [203] J. e. Morley, allen s. Levine, h. steven Beyer, arshag d. Mooradian, fran e. kaiser, david m. Brown, The effects of aging and diabetes mellitus on human red and white cell calmodulin levels (Chemotaxis/Phagocytosis/calcium), *Diabetes*. 33 (1984) 77–80.
- [204] P.N. Epstein, P.A. Overbeek, A.R. Means, Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice, *Cell*. 58 (1989) 1067–1073. doi:10.1016/0092-8674(89)90505-9.
- [205] Y. Ozturk, S. Aydin, V.M. Altan, N. Yildizoglu-Ari, A.T. OzÇelikay, Effect of short and long term streptozotocin diabetes on smooth muscle calmodulin levels in the rat, *Cell Calcium*. 16 (1994) 81–86. doi:10.1016/0143-4160(94)90003-5.

- [206] K. Ding, Z. Jia, Q. Wang, X. He, N. Tian, R. Tong, X. Wang, Electrochemical behavior of the self-assembled membrane formed by calmodulin (CaM) on a Au substrate, *J. Electroanal. Chem.* 513 (2001) 67–71. doi:10.1016/S0022-0728(01)00576-9.
- [207] J. Stigler, M. Rief, Calcium-dependent folding of single calmodulin molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 17814–17819. doi:10.1073/pnas.1201801109.
- [208] Y. Komeiji, Y. Ueno, M. Uebayasi, Molecular dynamics simulations revealed Ca²⁺-dependent conformational change of Calmodulin., *FEBS Lett.* 521 (2002) 133–139. doi:10.1016/S0014-5793(02)02853-3.
- [209] C.M. Shepherd, H.J. Vogel, A Molecular Dynamics Study of Ca²⁺-Calmodulin: Evidence of Interdomain Coupling and Structural Collapse on the Nanosecond Timescale, *Biophys. J.* 87 (2004) 780–791. doi:10.1529/biophysj.103.033266.
- [210] N.A. Galeva, S.W. Esch, T.D. Williams, M.M. Lye, T.C. Squier, Rapid method for quantifying the extent of methionine oxidation in intact calmodulin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1470–1480. doi:10.1016/j.jasms.2005.04.009.
- [211] I.P.G. Fernandes, A.M. Oliveira-Brett, Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation, *Bioelectrochemistry.* (2017). doi:10.1016/j.bioelechem.2016.10.002.
- [212] B. Razani, S.E. Woodman, M.P. Lisanti, Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology, *Pharmacol. Rev.* 54 (2002) 431–467.
- [213] R.G.W. Anderson, THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 199–225.
- [214] P. Nassoy, C. Lamaze, Stressing caveolae new role in cell mechanics, *Trends Cell Biol.* 22 (2012) 381–389. doi:10.1016/j.tcb.2012.04.007.
- [215] R.G. Parton, K. Simons, The multiple faces of caveolae, *Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 185–194. doi:10.1038/nrm2122.
- [216] E.J. Smart, Y.S. Ying, W.C. Donzell, R.G.W. Anderson, A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29427–29435. doi:10.1074/jbc.271.46.29427.
- [217] M. Murata, J. Peranen, R. Schreinert, F. Wielandt, T. V Kurzchalia, K. Simons, VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein (membrane microdomains/intracellular transport/membrane reconstitution), *Cell Biol.* 92 (1995) 10339–10343. doi:10.1016/0009-3084(80)90037-7.
- [218] A.F. Quest, L. Leyton, M. Párraga, Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease, *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 129–144. doi:10.1139/o03-071.
- [219] T. V Kurzchalia, R.G. Parton, Membrane microdomains and caveolae, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 424–431.

- [220] J. Harris, D. Werling, J.C. Hope, G. Taylor, C.J. Howard, Caveolae and caveolin in immune cells: Distribution and functions, *Trends Immunol.* 23 (2002) 158–164. doi:10.1016/S1471-4906(01)02161-5.
- [221] D.W. Zaas, Z. Swan, B.J. Brown, J.R. Wright, S.N. Abraham, The expanding roles of caveolin proteins in microbial pathogenesis, *Commun. Integr. Biol.* 2 (2009) 535–537. doi:10.4161/cib.2.6.9259.
- [222] T.M. Williams, M.P. Lisanti, The caveolin proteins., *Genome Biol.* 5 (2004) 214. doi:10.1186/gb-2004-5-3-214.
- [223] E. Shvets, A. Ludwig, B.J. Nichols, News from the caves: Update on the structure and function of caveolae, *Curr. Opin. Cell Biol.* 29 (2014) 99–106. doi:10.1016/j.ceb.2014.04.011.
- [224] M.P. Lisanti, Z. Tang, P.E. Scherer, E. Kübler, a J. Koleske, M. Sargiacomo, Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation., *Mol. Membr. Biol.* 12 (1995) 121–124. doi:10.3109/09687689509038506.
- [225] T.M. Williams, M.P. Lisanti, Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2005) C494-506. doi:10.1152/ajpcell.00458.2004.
- [226] K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell, J.R. Glenney, R.G.W. Anderson, Caveolin , a Protein Component of Caveolae Membrane Coats, *Cell.* 68 (1992) 673–682.
- [227] H.N. Fridolfsson, D.M. Roth, P.A. Insel, H.H. Patel, Regulation of intracellular signaling and function by caveolin, *FASEB J.* 28 (2014) 3823–3831. doi:10.1096/fj.14-252320.
- [228] C. Boscher, I.R. Nabi, caveolin-1: Role in cell signalling, *Adv. Exp. Med. Biol.* 729 (2012). doi:10.1007/978-1-4614-1222-9.
- [229] T. Okamoto, A. Schlegel, P.E. Scherer, M.P. Lisanti, Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing“Preassembled signaling complexes” at the plasma membrane, *J Biol Chem.* 273 (1998) 5419–5422. doi:10.1074/jbc.273.10.5419.
- [230] M. Rudick, R.G.W. Anderson, Multiple functions of caveolin-1, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41295–41298. doi:10.1074/jbc.R200020200.
- [231] T. Shiroto, N. Romero, T. Sugiyama, J.L. Sartoretto, H. Kalwa, Z. Yan, H. Shimokawa, T. Michel, Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0087871.
- [232] A.F.G. Quest, J.L. Gutierrez-Pajares, V.A. Torres, Caveolin-1: An ambiguous partner in cell signalling and cancer, *J. Cell. Mol. Med.* 12 (2008) 1130–1150. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00331.x.

- [233] U.E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, M.P. Lisanti, Caveolae and signalling in cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 15 (2015) 225–237. doi:10.1038/nrc3915.
- [234] W.C. Sessa, Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 100 (2005) 15–18. doi:/S0074-02762005000900004.
- [235] J.P. Otis, M.-C. Shen, V. Quinlivan, J.L. Anderson, S.A. Farber, Intestinal epithelial cell caveolin 1 regulates fatty acid and lipoprotein cholesterol plasma levels, *Dis. Model. Mech*. 10 (2017) 283–295. doi:10.1242/dmm.027300.
- [236] J.I. Luoma, M.I. Boulware, P.G. Mermelstein, Caveolin proteins and estrogen signaling in the brain, *Mol. Cell. Endocrinol*. 290 (2008) 8–13. doi:10.1016/j.mce.2008.04.005.
- [237] B. Razani, A. Schlegel, M.P. Lisanti, Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy., *J. Cell Sci*. 113 (2000) 2103–9. <http://jcs.biologists.org/content/113/12/2103.abstract>.
- [238] J. Gumulec, J. Sochor, M. Hlavna, M. Sztalmachova, S. Krizkova, P. Babula, R. Hrabec, A. Rovny, V. Adam, T. Eckschlager, R. Kizek, M. Masarik, Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker, *Oncol. Rep*. 27 (2012) 831–841. doi:10.3892/or.2011.1587.
- [239] P. Liu, M. Rudick, R.G.W. Anderson, MULTIPLE FUNCTIONS OF CAVEOLIN-1, *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol. Inc.* (2002) 1–41.
- [240] R.G. Parton, M.A. del Pozo, Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers, *Mol. Cell Biol*. 14 (2013) 98–112. doi:10.1038/nrm3512.
- [241] R. Gupta, C. Toufaily, B. Annabi, Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer, *Biochimie*. 107 (2014) 188–202. doi:10.1016/j.biochi.2014.09.010.
- [242] D. Brott, S. Gould, H. Jones, J. Schofield, H. Prior, J.P. Valentin, S. Bjurstrom, K. Kenne, I. Schuppe-Koistinen, A. Katein, L. Foster-Brown, G. Betton, R. Richardson, G. Evans, C. Loudon, Biomarkers of drug-induced vascular injury, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 207 (2005) 441–445. doi:10.1016/j.taap.2005.04.028.
- [243] F. Sotgia, U.E. Martinez-Outschoorn, M.P. Lisanti, Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention?, *BMC Med*. 9 (2011) 62. doi:10.1186/1741-7015-9-62.
- [244] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electroanalysis*, Oxford University Press, New York, 1998. https://books.google.pt/books/about/Electroanalysis.html?id=7dzvAAAAMAAJ&redir_esc=y.
- [245] A.M.C.F.O. Brett, C.M.A. Brett, *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*, Almedina, New York, 1993. http://www.almedina.net/catalog/product_info.php?products_id=4691.

- [246] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 702. doi:10.1021/ed060p702.
- [247] C.H. Bamford, R.G. Compton, *Comprehensive Chemical Kinetics 26 - Electrode Kinetics Principles and Methodology* -, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [248] D.D. Macdonald, *Transient Techniques in Electrochemistry*, 1st ed., Plenum Press, New York, 1979. doi:10.1149/1.2128855.
- [249] E. Laviron, Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry, *J. Electroanal. Chem.* 52 (1974) 355–393. doi:10.1016/S0022-0728(74)80448-1.
- [250] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979) 19–28. doi:10.1016/S0022-0728(79)80075-3.
- [251] E. Laviron, R. Meunier-Prest, R. Lacasse, The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part IV. The reduction of p-nitrobenzophenone between $H_0 = -5$ and pH 14, *J. Electroanal. Chem.* 375 (1994) 263–274. doi:10.1016/0022-0728(94)03399-4.
- [252] R. Pauliukaite, A.M. Chiorcea Paquim, A.M. Oliveira Brett, C.M.A. Brett, Electrochemical, EIS and AFM characterisation of biosensors: Trioxysilane sol-gel encapsulated glucose oxidase with two different redox mediators, *Electrochim. Acta.* 52 (2006) 1–8. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.081.
- [253] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 1980.
- [254] D. Benito, C. Gabrielli, J.J. Garc??a-Jareo, M. Keddou, H. Perrot, F. Vicente, An electrochemical impedance and ac-electrogravimetry study of PNR films in aqueous salt media, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 613–619. doi:10.1016/S1388-2481(02)00387-9.
- [255] J.J. O’Dea, A. Ribes, J.G. Osteryoung, Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate, *J. Electroanal. Chem.* 345 (1993) 287–301. doi:10.1016/0022-0728(93)80485-Z.
- [256] E. Laviron, R. Meunier-Prest, Theory of EC1, EC2, EC1E, EEC1 and irreversible surface reactions in polarography, *J. Electroanal. Chem.* 375 (1994) 79–87. doi:10.1016/0022-0728(94)03398-6.
- [257] J.R. Macdonald, Impedance spectroscopy: old problems and new developments, *Electrochim. Acta.* 35 (1990) 1483–1492. doi:10.1016/0013-4686(90)80002-6.
- [258] G.Z. Sauerbrey, Use of crystal oscillators for weighing thin films and for microweighing, *Physik.* 155 (1959) 206–222. doi:10.1007/bf01337937.
- [259] R. Calinas, M.T. Vieira, P.J. Ferreira, The effect of nitrogen on the formation of nanocrystalline copper thin films, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 3921–3926. doi:10.1166/jnn.2009.NS90.

- [260] A. Arnau, *Piezoelectric Transducers and Applications*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004. doi:10.1007/978-3-662-05361-4.
- [261] Y. Lai, L. Ma, W. Huang, X. Yu, Y. Zhang, H. Ji, J. Tian, Synthesis and biological evaluation of 3-[4-(amino/methylsulfonyl)phenyl]methylene-indolin-2-one derivatives as novel COX-1/2 and 5-LOX inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 7349–7353. doi:10.1016/j.bmcl.2010.10.056.
- [262] L. Zhou, Y. Liu, W. Zhang, P. Wei, C. Huang, J. Pei, Y. Yuan, L. Lai, Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3440–3443. doi:10.1021/jm0602357.
- [263] T. Sandmeyer, *Über Isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen*, *Helv. Chim. Acta.* 2 (1919) 234–242. doi:10.1002/hlca.19190020125.
- [264] B.N.M. Da Silva, R.S. Bastos, B. V. Silva, A.C. Pinto, Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida, *Quim. Nova.* 33 (2010) 2279–2282. doi:10.1590/S0100-40422010001000043.
- [265] B. V. Silva, Isatin, a versatile molecule: Studies in Brazil, *J. Braz. Chem. Soc.* (2013). doi:10.5935/0103-5053.20130089.
- [266] B. V. Silva, P.M. Esteves, A.C. Pinto, Chlorination of isatins with trichloroisocyanuric acid, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 257–263. doi:10.1590/S0103-50532011000200010.
- [267] C.S. Marvel, G.S. Hiers, *Isatin*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1941. doi:10.1002/0471264180.os005.23.
- [268] A.A. Esmaili, S. Amini, A. Bodaghi, A novel synthesis of spiro-2,5-dihydro-1,2- λ^5 -oxaphospholes using a three-component reaction, *Synlett.* 9 (2007) 1452–1454. doi:10.1055/s-2007-980357.
- [269] T. Aboul-Fadl, F.A.-H. Mohammed, E.A.-S. Hassan, Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (inh), *Arch. Pharm. Res.* 26 (2003) 778–784. doi:10.1007/BF02980020.
- [270] S.J. Garden, J.C. Torres, L.E. da Silva, A.C. Pinto, A Convenient Methodology for the N-Alkylation of Isatin Compounds, *Synth. Commun.* 28 (1998) 1679–1689. doi:10.1080/00397919808006872.
- [271] R.J. Beynon, J.S. Easterby, *Buffer Solutions*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [272] A.S. Al-Ayed, M.S. Ali, H.A. Al-Lohedan, A.M. Al-Sulaim, Z.A. Issa, Kabir-ud-Din, Micellar effects on the alkaline hydrolysis of isatin and its derivatives, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 393–399. doi:10.1016/j.jcis.2011.02.004.
- [273] F. D. King, *Medicinal Chemistry: Principles and Practice.*, 2nd editio, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002. doi:10.1021/JM030058Z.

- [274] H. Lund, O. Hammerich, Organic electrochemistry, 4th editio, M. Dekker, New York, 2001. https://books.google.pt/books/about/Organic_Electrochemistry_Fourth_Edition.html?id=tBxxZclgKyMC&source=kp_cover&redir_esc=y.
- [275] M.S. Baymak, H. Celik, H. Lund, P. Zuman, Reduction of diprotonated form of aryl hydrazones, *J. Electroanal. Chem.* 589 (2006) 7–14. doi:10.1016/j.jelechem.2005.11.038.
- [276] I.P.G. Fernandes, S.C.B. Oliveira, M. Ghalkhani, S. Shahrokhian, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical Oxidation Mechanisms of the Antioxidants Daidzein and 7-Hydroxy-4-chromone, *Electroanalysis*. 24 (2012) 618–626. doi:10.1002/elan.201100629.
- [277] R. Schnepf, A. Sokolowski, J. Muller, V. Bachler, K. Wieghardt, P. Hildebrandt, Resonance Raman spectroscopic study of phenoxyl radical complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 2352–2364. doi:10.1021/ja972269x.
- [278] Z. Ezerskis, Z. Jusys, Oxidation of chlorophenols on Pt electrode in alkaline solution studied by cyclic voltammetry, galvanostatic electrolysis, and gas chromatography-mass spectrometry, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1929–1940. doi:10.1351/pac200173121929.
- [279] Y. Zhang, C. Wang, C. Xu, C. Yang, Z. Zhang, H. Yan, K. Liu, Morpholino-decorated long circulating polymeric micelles with the function of surface charge transition triggered by pH changes, *Chem. Commun.* 49 (2013) 7286. doi:10.1039/c3cc43334j.
- [280] S.C. B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 4599–4605. doi:10.1016/j.electacta.2010.03.016.
- [281] A. M. Oliveira-Brett, C.M.A. Brett, L. a Silva, An impedance study of the adsorption of nucleic acid bases at glassy carbon electrodes., *Bioelectrochemistry*. 56 (2002) 33–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009439>.
- [282] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation, *Electrochem. Commun.* 23 (2012) 114–117. doi:10.1016/j.elecom.2012.06.027.
- [283] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, Direct electrochemistry of native and denatured anticancer antibody rituximab at a glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. 25 (2013) 1029–1034. doi:10.1002/elan.201200552.
- [284] R.G. Parton, Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation, *J. Cell Sci.* (2006). doi:10.1242/jcs.02853.
- [285] J.A. Schellman, Fifty years of solvent denaturation □, *Biophys. Chem.* 96 (2002) 91–101. <http://cemunse1.unse.edu.ar/Pdf/r1653.pdf> (accessed June 20, 2017).

CAPÍTULO 10

Artigos Publicados





Isatin nitro-derivatives redox behaviour

Severino Carlos B. Oliveira^a, Isabel P.G. Fernandes^a, Bárbara V. Silva^b, Angelo C. Pinto^b, Ana Maria Oliveira-Brett^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

^b Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21945-970 Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2012

Received in revised form 6 September 2012

Accepted 16 October 2012

Available online 26 October 2012

Keywords:

Isatin derivatives

Hydrazones

Semicarbazones

Redox behaviour

Glassy carbon electrode

ABSTRACT

Isatin derivatives possess a broad pharmacological profile and clinical applications, and the electrochemical behaviour of isatin-3-hydrazone, 7-methylisatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone, isatin-3-thiosemicarbazone, 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone and 5-nitroisatin, at a glassy carbon electrode, using cyclic, square-wave and differential pulse voltammetry over a wide pH range, was investigated and compared with isatin. The oxidation mechanism of isatin-hydrazone and isatin-semicarbazone derivatives is an irreversible, pH-dependent, adsorption-controlled process, and occurs in two consecutive charge transfer reactions with the formation of electroactive oxidation products, and their reduction mechanism is similar to the reduction of isatin, one single irreversible, pH-dependent cathodic process. The redox processes of isatin-hydrazone derivatives are associated with the hydrazone group, and for isatin-semicarbazone derivatives with the semicarbazone group. The oxidation mechanism of nitroisatin is also similar to isatin but the reduction is an irreversible, pH-dependent process that occurs in two consecutive charge transfer reactions with the formation of one electroactive reduction product. The results showed that all functional groups attached to the isatin ring structure give rise to different redox mechanisms, and the isatin derivatives investigated present new redox properties.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Isatin (indole-2,3-dione), **Scheme 1**, is a versatile heterocyclic compound present in humans as a metabolic derivative of adrenaline [1] and has also been found as a natural product in a number of plants, such as genus *Isatis*, in *Calanthe discolor* LINDL. and in *Couropita guianensis* Aubl. [2,3]. Isatin was initially discovered as an inhibitor of monoamine oxidase (MAO), and subsequently identified as a selective inhibitor of MAO B [4,5], but its function as a modulator of different biochemical processes has been a subject of discussion during the past decade. Further investigations have shown that isatin acts as an antagonist of both atrial natriuretic peptide-stimulated [6] and nitric oxide-stimulated [7] guanylate cyclase activity. Isatin has a distinct and discontinuous distribution in brain and other tissues; the highest concentrations (0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ or $\sim 1 \mu\text{M}$) in the brain was found in the hippocampus and cerebellum [8,9].

Isatin is a synthetically versatile substrate, which can be used for the synthesis of a wide variety of isatin derivatives possessing a broad pharmacological profile and clinical applications [3,10,11].

Isatin-hydrazone derivatives, **Scheme 1**, belong to an important group of compounds called hydrazones. The presence of the azometine proton $-\text{NHN}=\text{CH}-$ is important for the development of new drugs [12,13], and it was demonstrated that they possess, antimicrobial, anticonvulsant, analgesic, antiinflammatory, antiplatelet, antitubercular and antitumoral activities [14].

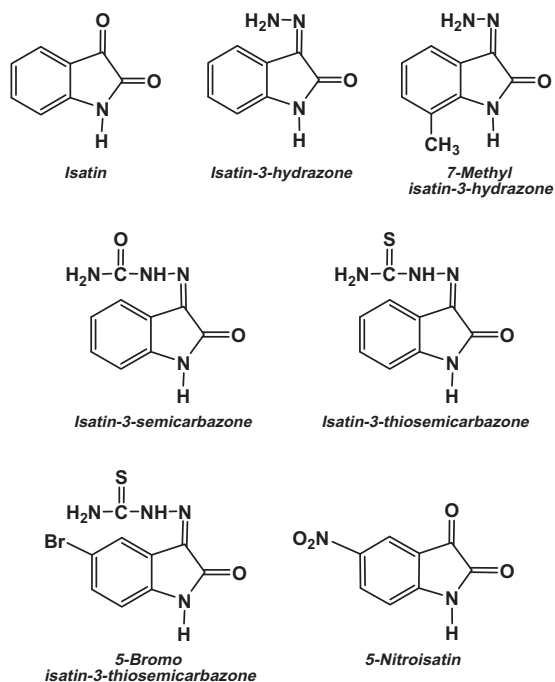
Isatin-semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives, **Scheme 1**, are potential ketone inhibitors of parasitic cysteine proteases identified in trypanosomes and malaria parasites [15–17].

The use of electrochemical techniques to clarify drug mechanisms of action is very important in drug discovery. Many factors must be considered in drug discovery, such as *in vivo* drug activity, stereochemistry, diffusion, solubility, metabolism, and redox reactions involved in physiological processes. Therefore, it is relevant to investigate the electron transfer pathways of biological reactions, as the electrochemical data is correlated with the molecular structure and the pharmacological activity, providing useful information on the mechanism of the compounds with living cells. The electrochemical techniques used, such as cyclic, square wave and differential pulse voltammetry, are fast and have high sensitivity and selectivity [18–21].

Isatin nitro-derivatives have different medical applications and the investigation of their redox mechanisms using electrochemical techniques to clarify *in vivo* drug activity, stereochemistry,

* Corresponding author. Tel./fax: +351 239 835295.

E-mail address: brett@ci.uc.pt (A.M. Oliveira-Brett).



Scheme 1. Chemical structures of isatin and isatin derivatives.

diffusion, solubility, metabolism, and redox reactions involved in physiological processes is of great relevance.

There are some studies concerning the redox behaviour of isatin and of its derivatives in aqueous and non-aqueous media, using cyclic voltammetry and glassy carbon or mercury electrodes [22–25].

For the first time was investigated the redox behaviour of 6 nitro-isatin derivative compounds, isatin-3-hydrazone, 7-methylisatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone, isatin-3-thiosemicarbazone, 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone and 5-nitroisatin, Scheme 1, and the influence of isatin substituting groups on their redox properties, for a wide range of solution conditions using cyclic, and differential pulse voltammetry at a glassy carbon electrode.

A redox mechanism for the isatin-derivatives investigated is proposed and the information obtained using electrochemical methodology may play a crucial role in understanding the properties of these compounds as well as their metabolism in biological systems.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Isatin derivatives, isatin-3-hydrazone, 7-methylisatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone, isatin-3-thiosemicarbazone, 5-bro-

moisatin-3-thiosemicarbazone and 5-nitroisatin and isatin were synthesized [26–30]. Stock solutions of 1 mM isatin or isatin derivatives in ethanol were prepared and stored at 4 °C.

All supporting electrolyte solutions, Table 1 [31], were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$). Nitrogen saturated solutions were obtained by bubbling high purity N_2 for more than 10 min in the solution. During the voltammetric measurement a constant flux of N_2 was kept over the solution surface in order to avoid the diffusion of atmospheric oxygen into the solution. Microvolumes were measured using EP-10 and EP-100 Plus Motorized Microliter Pipettes (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-metre with an Ingold combined glass electrode.

All experiments were done at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.2. Voltammetric parameters and electrochemical cells

Voltammetric experiments were carried out using a $\mu\text{Autolab}$ potentiostat running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a glassy carbon working electrode (GCE) ($d = 1.0 \text{ mm}$), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 1 mL one-compartment electrochemical cell. In cyclic voltammetry (CV) was used a scan rate of 100 mV s^{-1} . The experimental conditions for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, and scan rate 5 mV s^{-1} . For square-wave (SW) voltammetry the experimental conditions were frequency 50 Hz and potential increment 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 100 mV s^{-1} . The GCE was polished using diamond spray (particle size $1 \mu\text{m}$, Kement, Kent, UK) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and various DP voltammograms were recorded until a steady state baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

2.3. Acquisition and presentation of voltammetric data

All DP voltammograms presented were background-subtracted and baseline-corrected using the moving average application with a step window of 2 mV included in the GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improves the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak current is in some cases reduced ($<10\%$) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental voltammograms for a better and clearer identification of the peaks. The values for peak current presented in all graphs were determined from the original untreated voltammograms after subtraction of the base line.

3. Results and discussion

The redox behaviour of isatin derivatives, isatin-3-hydrazone, 7-methylisatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone, isatin-3-thiosemicarbazone, 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone and 5-nitroisatin, Scheme 1, in $\sim 200 \mu\text{M}$, in $\text{pH} = 7.0$ 0.1 M phosphate buffer N_2 saturated solutions, at a GCE, scan rate 100 mV s^{-1} , using CV was investigated.

All isatin-substituted derivatives were electroactive and oxidation and reduction peaks occurred. However, the reduction and the oxidation mechanisms were independent of each other for all compounds, so they were investigated separately.

Table 1
Supporting electrolytes, 0.1 M ionic strength [27].

pH	Composition
2.0	HCl + KCl
3.3	HAcO + NaAcO
4.4	HAcO + NaAcO
5.2	HAcO + NaAcO
5.9	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$
6.9	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$
8.0	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$
9.2	$\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$
11.2	$\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$

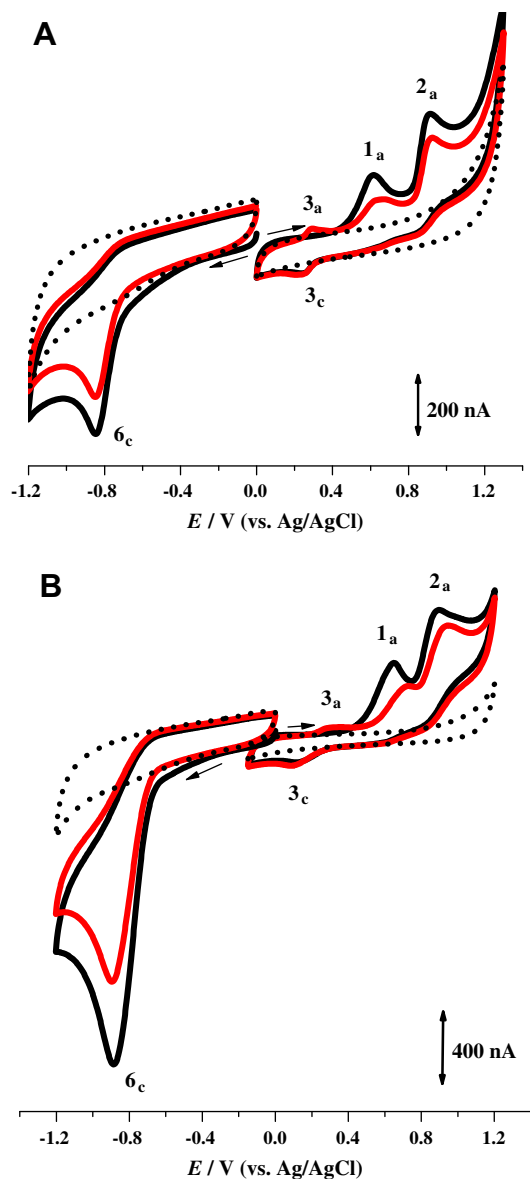


Fig. 1. CVs in (•••) supporting electrolyte pH = 7.0 0.1 M phosphate buffer: (A) 186 μM isatin-3-hydrazone and (B) 260 μM 7-methylisatin-3-hydrazone (—) first, (—) second scans, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

3.1. Oxidation

3.1.1. Cyclic voltammetry

CVs in the potential range 0.0 V till +1.3 V, in physiological 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, of isatin derivatives, isatin-3-hydrazone, 7-methylisatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone, isatin-3-thiosemicarbazone, 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone and 5-nitroisatin and isatin, were performed.

3.1.1.1. Isatin-hydrzones. CVs in solutions of 186 μM isatin-3-hydrazone and of 260 μM 7-methylisatin-3-hydrazone are presented in Fig. 1 and the data summarised in Table 2.

Two consecutive irreversible oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.60 \text{ V}$, and peak 2_a, at $E_{p2a} = +0.90 \text{ V}$, occurred, which are associated with the oxidation of the hydrazone group, Fig. 1A and B. On the first negative-going reverse cycle cathodic peaks, peak 3_c, at $E_{p3c} = +0.25 \text{ V}$, for isatin-3-hydrazone, Fig. 1A, and peak 3_c, at $E_{p3c} = +0.11 \text{ V}$, for 7-methylisatin-3-hydrazone, Fig. 1B, ap-

peared. The peak 3_c corresponds to the reduction of the isatin-hydrazone oxidation product formed at the GCE surface after isatin-hydrazone oxidation in the first positive-going cycle. In a new scan, with a clean electrode, inverting the potential before the peak 2_a, the peak 3_c does not occur. Consequently, the electroactive isatin-hydrazone oxidation product, peak 3_c is associated with the products formed in peak 2_a, the second oxidation process.

After successive CVs in isatin-3-hydrazone, without polishing the electrode between the cycles, a new oxidation peak 3_a, at $E_{p3a} = +0.28 \text{ V}$, occurred showing the reversibility of peak 3_c. The ratio of peaks 3_a–3_c current is one and the peaks separation is $|E_{p3a} - E_{p3c}| = 30 \text{ mV}$. Considering that $|E_{pa} - E_{pc}| \sim 2.3 \text{ RT/nF}$ (or $59/n \text{ mV}$ at 25°C), two electrons are involved in this reversible reaction, Fig. 1A. However, for 7-methylisatin-3-hydrazone peak 3_a is not reversible, Fig. 1B.

CVs for different scan rates in 186 μM isatin-3-hydrazone in pH = 7.0, showed that increasing the scan rate, the peak 1_a current also increased, but it was not a diffusion-controlled irreversible oxidation process [18], as the relationship between I_{pa} of peak 1_a and the square root of the scan rate was not linear, due to the strong adsorption of isatin-3-hydrazone and/or its oxidation products on the hydrophobic GCE surface, in agreement with the highly hydrophobic character of isatin [25,32,33].

3.1.1.2. Isatin-semicarbazones. CVs in solutions of 500 μM of isatin-3-semicarbazone and of 167 μM of 5-bromoisatin-thiosemicarbazone are presented in Fig. 2 and the data summarised in Table 2.

Two consecutive irreversible oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.80 \text{ V}$, and peak 2_a, at $E_{p2a} = +0.94 \text{ V}$, for isatin-3-semicarbazone, Fig. 2A, and peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.86 \text{ V}$, and peak 2_a, at $E_{p2a} = +1.05 \text{ V}$, for 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone, Fig. 2B, were observed.

On the first negative-going reverse cycle for isatin-3-semicarbazone, two reversible cathodic peaks, peak 3_c, at $E_{p3c} = +0.27 \text{ V}$, and peak 4_c, at $E_{p4c} = +0.46 \text{ V}$, appeared, Fig. 2A. The ratio of peaks 3_c–3_a and 4_c–4_a currents are one and the peak potential separation correspond to two electrons involved in each process, Fig. 2A and Table 2. However, for 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone no reduction process on the first negative-going reverse cycle was observed.

3.1.1.3. Nitroisatin. CVs in solutions of 260 μM of 5-nitroisatin are presented in Fig. 3A and the data summarised in Table 2. Two consecutive irreversible oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.98 \text{ V}$, and the peak 2_a, at $E_{p2a} = +1.10 \text{ V}$, occurred for 5-nitroisatin, Fig. 3A, the peak currents are very low and the peak potential more positive than for the other isatin-substituted derivatives.

3.1.1.4. Isatin. CVs in solutions of 500 μM isatin are presented in Fig. 3B and the data summarised in Table 2. In the first scan two consecutive irreversible oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +1.10 \text{ V}$, and the peak 2_a, at $E_{p2a} = +1.24 \text{ V}$, for isatin, Fig. 3A, appeared and their peak currents decreased in subsequent scans due to strong adsorption of isatin and of its oxidation products on the GCE surface.

3.1.2. Differential pulse voltammetry. Effect of pH

The effect of pH on the electrochemical oxidation of isatin-3-hydrazone, isatin-3-semicarbazone and isatin in low concentrations was studied using DP voltammetry in different electrolytes 0.1 M ionic strength over a range between 2.0 < pH < 12.0, Table 1.

3.1.2.1. Isatin-3-hydrazone. The DP voltammograms in 10 μM isatin-3-hydrazone showed that the oxidation occurs in two steps, peaks 1_a and 2_a, Fig 4A.

Table 2
Isatin derivatives oxidation potentials obtained by CV.

Isatin derivatives	Potential/V (vs. Ag/AgCl)		
	Scan 1	Scan 2	
Isatin-3-hydrazone	$E_{p1a} = +0.60$ V $E_{p2a} = +0.90$ V	$E_{p1a} = +0.62$ V $E_{p2a} = +0.92$ V	$E_{p3c} = +0.25$ V $E_{p3a} = +0.28$ V
7-Methylisatin-3-hydrazone	$E_{p1a} = +0.64$ V $E_{p2a} = +0.90$ V	$E_{p1a} = +0.70$ V $E_{p2a} = +0.93$ V	$E_{p3c} = +0.11$ V $E_{p3a} = +0.32$ V
Isatin-3-semicarbazone	$E_{p1a} = +0.80$ V $E_{p2a} = +0.94$ V	– $E_{p2a} = +0.90$ V	$E_{p3c} = +0.27$ V $E_{p3a} = +0.30$ V $E_{p4c} = +0.46$ V $E_{p4a} = +0.49$ V
Isatin-3-thiosemicarbazone	$E_{p1a} = +0.62$ V $E_{p2a} = +0.86$ V	– $E_{p2a} = +0.90$ V	–
5-Bromoisatin-3-thiosemicarbazone	$E_{p1a} = +0.86$ V $E_{p2a} = +1.05$ V	– $E_{p2a} = +0.90$ V	–
5-Nitroisatin	$E_{p1a} = +0.98$ V $E_{p2a} = +1.10$ V	– $E_{p2a} = +1.10$ V	–
Isatin	$E_{p1a} = +1.10$ V $E_{p2a} = +1.24$ V	$E_{p1a} = +1.16$ V $E_{p2a} = +1.20$ V	–

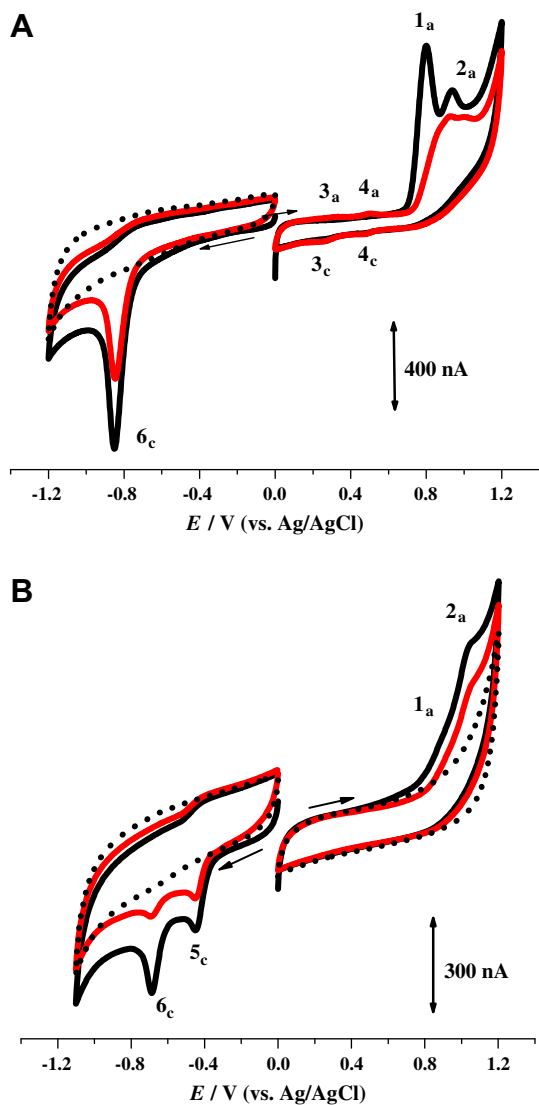


Fig. 2. CVs in (●●●) supporting electrolyte pH = 7.0, 0.1 M phosphate buffer: (A) 500 μ M isatin-3-semicarbazone and (B) 167 μ M 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone; (—) first, (—) second scans, $\nu = 100$ mV s⁻¹.

For $2.0 < \text{pH} < 9.0$ the peaks 1_a and 2_a potential shifted to more negative values with increasing pH, Fig. 4A and B. In the E_{pa} vs. pH plot, Fig. 4B, the slope of the dotted line, -59 mV per pH unit, showed that the mechanism of both oxidation processes, peak 1_a and peak 2_a , involves the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred n , was determined by the peak width at half height, $W_{1/2} \approx 100$ mV for peak 1_a , and $W_{1/2} \approx 78$ mV for peak 2_a and, for both peaks, is close to the theoretical value of 90 mV, corresponding to electrochemical reactions involving the transfer of one electron. Consequently, it can be concluded that these oxidation processes occur with the transfer of one electron and one proton. The plot of peaks 1_a and 2_a current vs. pH, Fig. 4A and B, shows that isatin-3-hydrazone peak currents are much higher for $2.0 \leq \text{pH} < 6.0$.

For $\text{pH} > 9.0$ the oxidation potential for both peaks is pH-independent, so the isatin-3-hydrazone undergoes chemical deprotonation in alkaline electrolytes involving an oxidation mechanism only with one electron.

The importance of these isatin substituted derivatives ionization in the *in vitro* prediction of *in vivo* absorption has been discussed. The role of pK_a on absorption is important, since this is often related to its effect on lipophilicity and solubility [20]. In order to measure pK_a values, it is necessary to investigate the analyte in different pH environments and to monitor the variation of potential as a function of the ionization state of the molecule. The value of $\text{pK}_a \sim 9$ for isatin-3-hydrazone was determined from data in Fig. 4B.

Successive DP voltammograms were recorded in a solution of 10 μ M of isatin-3-hydrazone in pH 7.0, Fig. 4C. The oxidation of isatin-3-hydrazone in the first scan occurs at peak 1_a , at $E_{p1a} = +0.60$ V, and peak 2_a at $E_{p2a} = +0.88$ V. During a second DP scan, one new peak occurs, peak 3_a at $E_{p3a} = +0.30$ V, and its amplitude increases with the number of scans, these results are in agreement with the CV, Fig. 1A.

The strong adsorption of isatin-3-hydrazone and its oxidation products at the GCE surface was confirmed when, after DP successive scans recorded in the isatin-3-hydrazone in pH = 7.0, the electrode was washed with a jet of deionized water and then transferred to the supporting electrolyte. The DP voltammogram obtained in these conditions showed the peaks 3_a , 1_a and 2_a , and this result confirms that the isatin-3-hydrazone and its oxidation product absorb strongly on GCE surface.

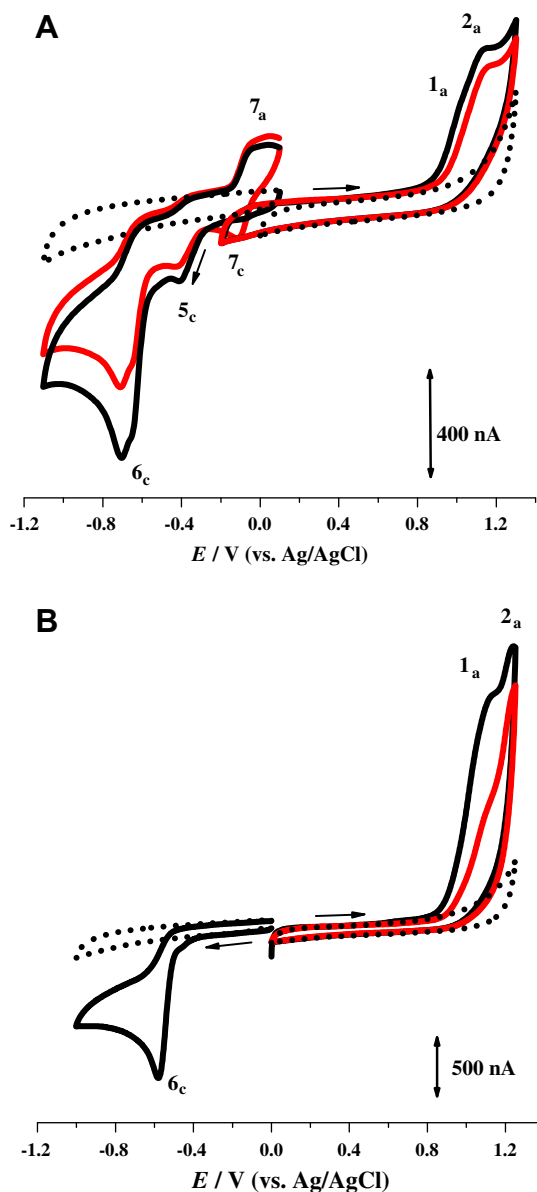


Fig. 3. CVs in (●●●) supporting electrolyte pH = 7.0 0.1 M phosphate buffer: (A) 260 μM 5-nitroisatin and (B) 500 μM isatin (—) first, (—) second scan, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

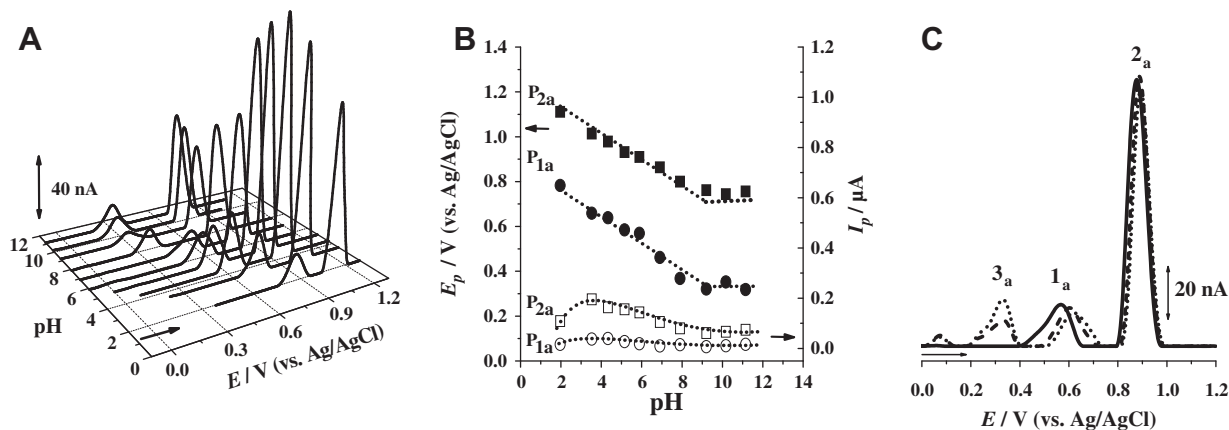


Fig. 4. (A) 3D plot of oxidation DP voltammograms in 10 μM isatin-3-hydrazone vs. pH. (B) Plot of peak 1a (●) E_{p1a} and (○) I_{p1a} , and of peak 2a (■) E_{p2a} and (□) I_{p2a} vs. pH. (C) DP voltammograms in 10 μM isatin-3-hydrazone in pH = 7.0, (—) first, (---) second and (●●●) third scans.

3.1.2.2. *Isatin-3-semicarbazone*. The DP voltammograms of 20 μM isatin-3-semicarbazone showed that the oxidation occurs in two steps, peaks 1_a and 2_a, Fig 5A.

For $3.0 < \text{pH} < 12.0$ the peaks 1_a and 2_a potential shifted to more negative values with increasing pH, Fig. 5A and B. In the E_{pa} vs. pH plot, Fig. 5B, the slope of the dotted line, $-59 \text{ mV per pH unit}$, showed that the mechanism of both oxidation processes, peaks 1_a and 2_a, involves the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred n , was determined by the peak width at half height, $W_{1/2} \approx 60 \text{ mV}$ for peak 1_a, and $W_{1/2} \approx 75 \text{ mV}$ for peak 2_a, corresponding to electrochemical reactions involving the transfer of one electron. Consequently, it can be concluded that these oxidation processes occur with the transfer of one electron and one proton.

The plot of peaks 1_a and 2_a current vs. pH, Fig. 5B, demonstrates that the peak currents are much higher for $2.0 < \text{pH} < 6.0$. This is due to the effect of pH on ionization of semicarbazone group and this consequently increases hydrophobicity and adsorption on the hydrophobic GCE surface.

3.1.2.3. *Isatin*. The DP voltammograms of 50 μM isatin showed that the oxidation occurs in two steps, peaks 1_a and 2_a and over the whole pH range its potentials shifted to more negative values with increasing pH, following the relation $-59 \text{ mV per pH unit}$, and showing that the mechanisms of peaks 1_a and 2_a, involves the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred, was determined by the peak width at half height, $W_{1/2} \approx 98 \text{ mV}$ for peak 1_a, and $W_{1/2} \approx 91 \text{ mV}$ for peak 2_a, corresponding to electrochemical reactions involving the transfer of one electron. Hence, it can be concluded that these oxidation processes occur with the transfer of one electron and one proton [25].

3.1.3. Square wave voltammetry

A greater advantage of SW voltammetry is the possibility to see during only one scan if the electron transfer reaction is reversible or not [18]. Since the current is sampled in both positive and negative-going pulses, peaks corresponding to the oxidation and reduction of the electroactive species at the electrode surface can be obtained in the same scan.

The SW voltammetric behaviour of isatin-3-semicarbazone and isatin in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, and effective scan rate of 100 mV s^{-1} , was investigated.

The first SW voltammogram in 20 μM isatin-3-semicarbazone, showed similar features to the CV and DP voltammograms, two oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.81 \text{ V}$, and peak 2_a, at $E_{p2a} = +0.93 \text{ V}$. The irreversibility of the isatin-3-semicarbazone

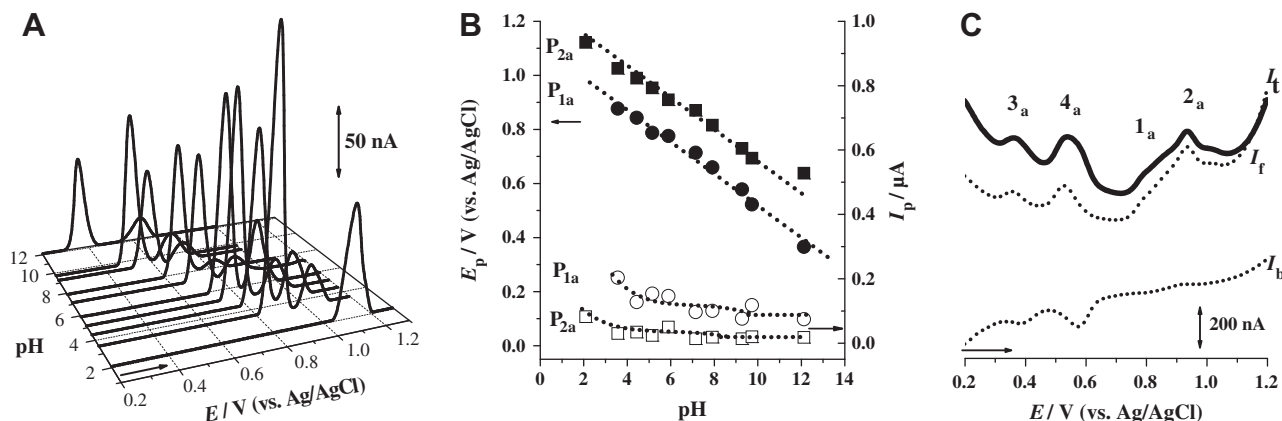


Fig. 5. (A) 3D plot of oxidation DP voltammograms baseline corrected in 20 μM isatin-3-semicarbazone vs. pH. (B) Plot of peak 1_a (●) E_{p1a} and (○) I_{p1a} , and of peak 2_a (■) E_{p2a} and (□) I_{p2a} vs. pH. (C) Second SW voltammograms in 20 μM isatin-3-semicarbazone in pH = 6.0. I_t – total current, I_f – forward current, I_b – backward current.

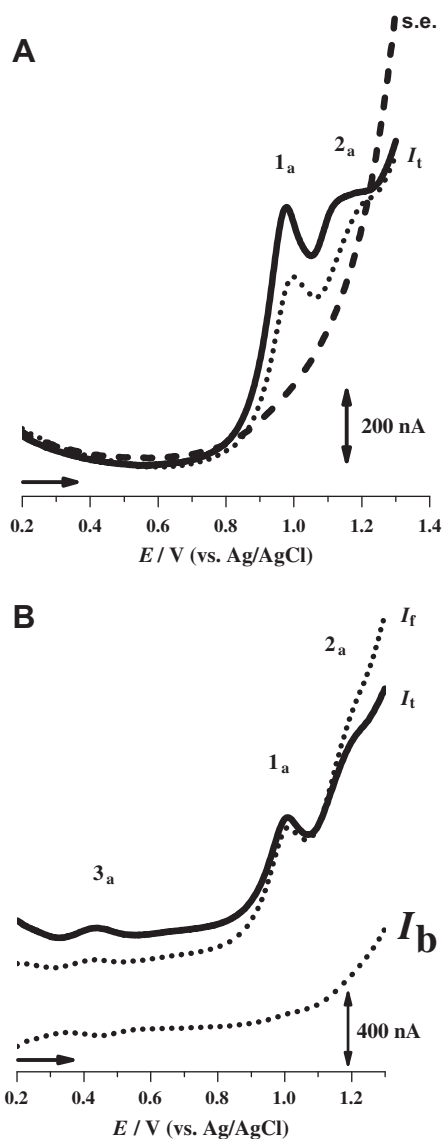
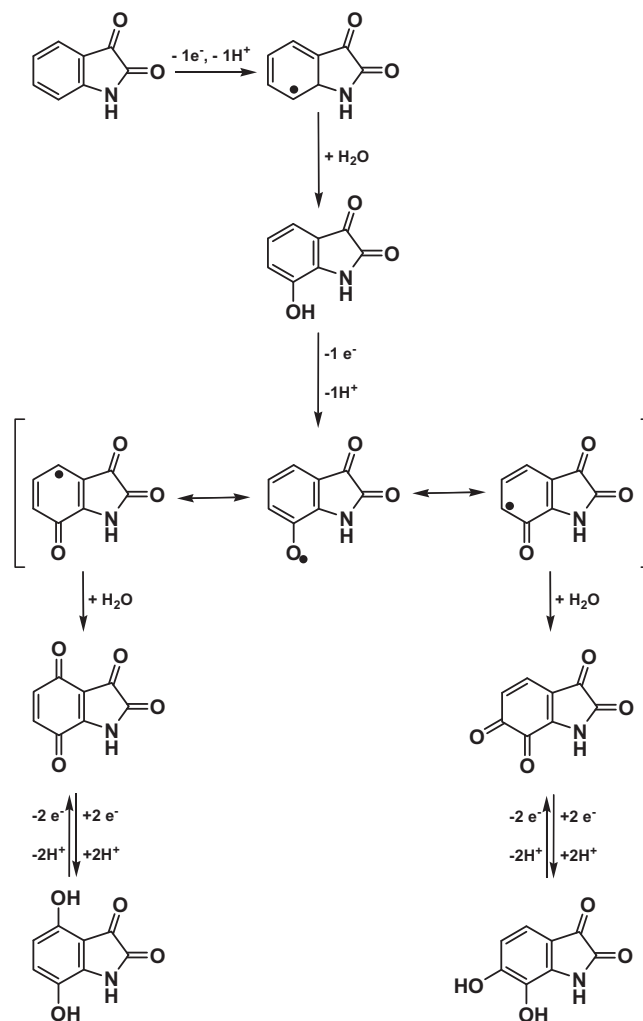
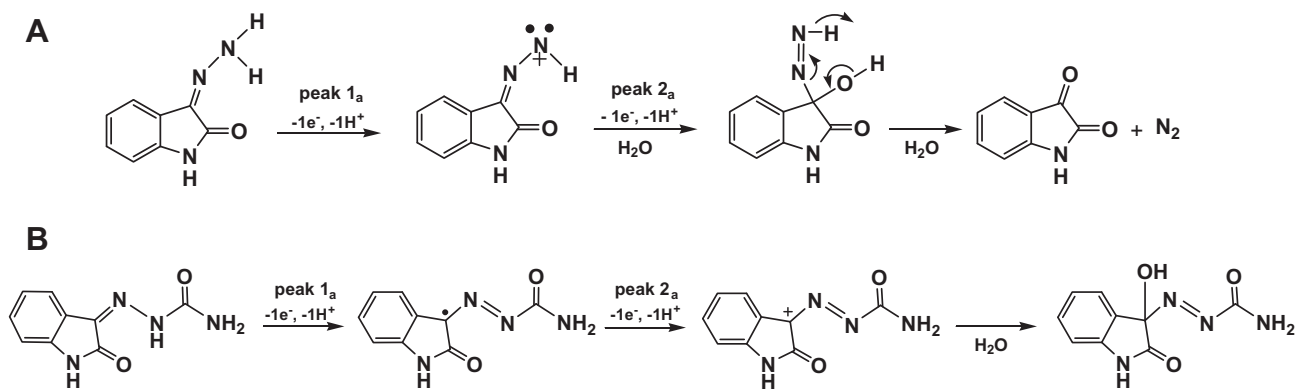


Fig. 6. SW voltammograms in 50 μM isatin in pH = 7 0.1 M phosphate buffer: (A) without conditioning the GCE, (---) supporting electrolyte (se), (—) first and (●●●) second scans of I_f . (B) after conditioning the GCE at +1.10 V for 60 s followed by +0.30 V during 60 s. I_t – total current, I_f – forward current, I_b – backward current.

peaks 1_a and 2_a was confirmed plotting the forward and backward components of the total current. The second SW voltammogram showed the occurrence of peak 3_a, at $E_{p3a} = +0.36$ V, and peak 4_a, at $E_{p4a} = +0.54$ V, corresponding to the reversible oxidation products of isatin-3-semicarbazone, Fig. 5C, also confirming the CV results, Fig. 2A.



Scheme 2. Proposed oxidation mechanism of isatin.



Scheme 3. Proposed oxidation mechanism: (A) isatin-3-hydrazone and (B) isatin-3-semicarbazone.

SW voltammograms in 50 μM isatin, showed two oxidation peaks, peak 1_a, at $E_{p1a} = +0.98\text{ V}$, and peak 2_a, at $E_{p2a} = +1.12\text{ V}$, and no isatin oxidation product could be observed even after successive recorded scans in the same solution, Fig. 6A.

To detect the oxidation product of isatin at the GCE surface, a clean electrode was immersed in a solution of 50 μM isatin and a potential of +1.10 V was applied during 60 s. This conditioning procedure allowed the oxidation of isatin molecules and the adsorption of the isatin oxidation products on the GCE surface. However, at this high potential the isatin oxidation products formed are immediately oxidised and on the SW voltammogram only a very small peak 3_a occurred.

The results were better when, after the first conditioning at +1.10 V, a potential of +0.30 V was applied for 60 s. During this period, the isatin oxidation products oxidised during the first conditioning step were reduced and, the SW voltammogram showed the peak 3_a, at $E_{p3a} = +0.44\text{ V}$, Fig. 6B. The reversibility of peak 3_a was confirmed plotting the forward and backward components of the total current, and noting that the oxidation and the reduction currents are equal, Fig. 6B.

3.1.4. Oxidation mechanism of isatin and isatin derivatives

The oxidation behaviour of isatin and isatin derivatives, with hydrazones, semicarbazones, thiosemicarbazones and nitro functional groups attached to the ring structure, Scheme 1, is different. The oxidation mechanisms in physiological pH = 7.0 proposed, Schemes 2 and 3, are based on CV, DP and SW voltammetry results, taking into account that the pyrrole ring is already oxidised in the C2 and C3 position, the electron-donor or electron-acceptor character of the benzene ring, and functional groups coupled to the isatin molecule [21,25,34–41].

3.1.4.1. Isatin. Isatin oxidation proceeds in successive steps on the benzene ring considering that the pyrrole ring is already oxidised in the C2 and C3 position [34,35]. In the first step, peak 1_a, one electron is removed from benzene ring, following deprotonation and direct nucleophilic attack by water with the production of the 7-hydroxyisatin. In the second step, peak 2_a corresponds to the oxidation of the 7-OH group produced in the first oxidation step.

Phenol oxidation involves the formation of a phenoxy radical that is oxidised in two pathways. In one phenol is oxidised to a quinone that is reversibly reduced, and in another pathway it initiates polymerization, leading to adsorbed products that can block the electrode surface [34,35]. It was found that the relative reaction rates of these two pathways depend on the pH and concentration of isatin. An oxidation mechanism for isatin is proposed, Scheme 2.

3.1.4.2. Isatin-3-hydrazone and isatin-3-semicarbazone. Isatin-3-hydrazone oxidation mechanism involves one electron and one proton transfer in both oxidation steps and is associated with the oxidation of the hydrazone group attached at C3 position, liberating N_2 and generating the isatin molecule [36–37], Scheme 3A. Consequently, as high positive potentials were applied, the isatin produced was also oxidised, Scheme 2, and peak 3_c occurred.

Isatin-3-semicarbazone oxidation involves one electron and one proton to form a free radical in the first step. The second oxidation step of the free radical gives a carbocation, Scheme 3B. Similarly, as high positive potentials were applied, the benzene ring was also oxidised, Scheme 2, and peaks 3_c and 4_c occurred.

The hydrazone and semicarbazone functional groups lead to the occurrence of new anodic peaks, and the absence of the isatin peaks, Figs. 1–3. Comparing peaks 1_a and 2_a of hydrazones and semicarbazones isatin derivatives, Figs. 1 and 2, with isatin, Fig. 3B, it was found their peak potentials were shifted to less positive potentials, the peak currents were higher and oxidation products were obtained.

The hydrazone and semicarbazone groups attached to the isatin molecule correspond to the oxidation process that occurs at a less positive potential, as these electron-donor groups are more easily oxidised and consequently have a better reducing power than the isatin [21,36–39].

3.1.4.3. 5-Bromoisatin-3-thiosemicarbazone. The CVs of the 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone, Fig. 2B, when compared with the CVs of the isatin-3-semicarbazone, Fig. 2A, showed that the current peak for the 5-bromoisatin-thiosemicarbazone is lower. This difference can be attributed to the steric effect of the bromine attached to the molecule which hinders the approaching of the semicarbazone group to the electrode surface.

3.1.4.4. Nitroisatin. The anodic behaviour of the isatin substituted that contains the nitro group, Fig. 3A, is different than that for all other substituents but similar to isatin since in this group oxidation does not occur. However, the oxidation peak current for nitroisatin is very small due to the electron withdrawing effect caused by the nitro group making the isatin molecule more positively charged and decreasing its donating character, so nitroisatin is oxidised with more difficulty at a high potential.

3.2. Reduction

3.2.1. Cyclic voltammetry

CVs in the potential range 0.0 V till -1.2 V , in N_2 saturated solutions, in physiological 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, in 186 μM isatin-3-hydrazone, 260 μM 7-methylisatin-3-hydrazone, 500 μM

Table 3
Isatin derivatives reduction potentials obtained by CV.

Isatin derivatives	Potential/V (vs. Ag/AgCl)		
	Scan 1	Scan 2	
Isatin-3-hydrazone	$E_{p6c} = -0.85$ V	$E_{p6c} = -0.84$ V	-
7-Methylisatin-3-hydrazone	$E_{p6c} = -0.87$ V	$E_{p6c} = -0.89$ V	-
Isatin-3-semicarbazone	$E_{p6c} = -0.85$ V	$E_{p6c} = -0.85$ V	-
Isatin-3-thiosemicarbazone	$E_{p6c} = -0.77$ V	$E_{p6c} = -0.77$ V	-
5-Bromoisatin-3-thiosemicarbazone	$E_{p5c} = -0.45$ V $E_{p6c} = -0.68$ V	$E_{p5c} = -0.44$ V $E_{p6c} = -0.68$ V	-
5-Nitroisatin	$E_{p5c} = -0.40$ V $E_{p6c} = -0.50$ V	$E_{p5c} = -0.40$ V $E_{p6c} = -0.70$ V	$E_{p7a} = -0.06$ V $E_{p7c} = -0.09$ V
Isatin	$E_{p6c} = -0.58$ V	$E_{p6c} = -0.60$ V	-

isatin-3-semicarbazone and 500 μ M isatin, Figs. 1–3 and Table 3, were obtained.

All CVs showed the same behaviour, one irreversible reduction peak 6_c, at $E_{p6c} \sim -0.8$ V, Table 3. However, isatin cathodic peak 6_c occurred at a more positive potential, at $E_{p6c} = -0.58$ V, Fig. 3B and Table 3.

Isatin cathodic peak 6_c is due to the reduction of the carbonyl group at position C3 in the pyrrole ring [25]. Isatin-hydrazone and semicarbazone derivatives peak 6_c, Figs. 1 and 2, and Table 3, was shifted to a more negative potential when compared with isatin, Fig. 3B and Table 3. Isatin-hydrazone and semicarbazone derivatives reduction mechanism, due to the electron-acceptor character of these functional groups [36,40], is associated with the hydrazone and semicarbazone groups attached in isatin at position C3.

The reduction of 167 μ M 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone, Fig. 2B and Table 3, showed two well successive irreversible reduction peaks, peak 5_c, at $E_{p5c} = -0.45$ V, and the peak 6_c, at $E_{p6c} = -0.68$ V. In the second scan peaks 5_c and 6_c current decreased due to the strong adsorption of 5-bromoisatin-3-thiosemicarbazone and its reduction products on the GCE surface. The reduction peak 5_c is due to the cleavage of carbon-bromine bond at position C5, Fig. 2B.

CVs of 260 μ M 5-nitroisatin showed two successive irreversible reduction peaks, peak 5_c, at $E_{p5c} = -0.40$ V, and peak 6_c, at $E_{p6c} = -0.70$ V, Fig. 3A. On the reverse positive-going scan of the first cycle, an anodic peak 7_a, at $E_{p7a} = -0.06$ V, corresponding to the oxidation of the 5-nitroisatin reduction product formed at the GCE surface. Successive scans of 5-nitroisatin without polishing the electrode surface between cycles clearly demonstrated a new reduction peak 7_c, at $E_{p7c} = -0.09$ V, confirming the two electrons transfer reversible reaction of peak 7_a, as peak currents are equal and $|E_{p7a} - E_{p7c}| = 30$ mV, Fig. 3A.

3.2.2. Differential pulse voltammetry. Effect of pH

The effect of pH on the electrochemical reduction of isatin-3-hydrazone and 5-nitroisatin was studied using DP voltammetry in different 0.1 M ionic strength electrolytes over a range between 2.0 < pH < 12, Table 1.

The DP voltammograms in different electrolytes of 10 μ M isatin-3-hydrazone showed only one irreversible pH-dependent reduction peak 6_c, the potential shifted to more negative values with increasing pH, due to a rapid protonation of the hydrazone group, which as all conjugate acids is more readily reduced than the base. The highest peak current was in acid media.

For 2.0 < pH < 9.0 the pH dependence was linear, with slope -59 mV per pH unit, so the same number of electrons and protons

is involved in the isatin-3-hydrazone reduction and as the width at half-height of peak 6_c is $W_{1/2} \sim 78$ mV, occurs with the transfer of one electron and one proton.

For pH > 9.0, the isatin-3-hydrazone reduction peak does not depend on pH indicating only one electron transfer, consistent with the CV results, and a reduction mechanism associated with the reduction of the hydrazone group attached to the isatin, and the cleavage of the nitrogen-nitrogen bond involving one electron and one proton transfer for pH < 9.0.

The DP voltammograms of 20 μ M 5-nitroisatin showed that the reduction occurs in two steps, peaks 5_c and 6_c, Fig. 7A.

Peak 5_c corresponds to 5-nitroisatin reduction on the nitro group attached in the isatin molecule, the potential shifts to more negative values with increasing pH, and only occurs for electrolytes with pH ≤ 10.0 , Fig. 7A and B. In the E_{p5c} vs. pH plot, Fig. 7B, the slope of the dotted line -59 mV per pH unit, shows that the mechanism involves the same number of electrons and protons. Taking into consideration that the width at half height of the 5-nitroisatin reduction peak 5_c was $W_{1/2} \sim 77$ mV, the reduction process involves the transfer of one electron and one proton.

For 2.0 < pH < 10.0 peak 6_c potential shifted to more negative values with increasing pH, Fig. 7A, and in the E_{p6c} vs. pH plot, Fig. 7B, the slope of the dotted line -59 mV per pH unit, showed that the peak 6_c mechanism involves the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred was determined

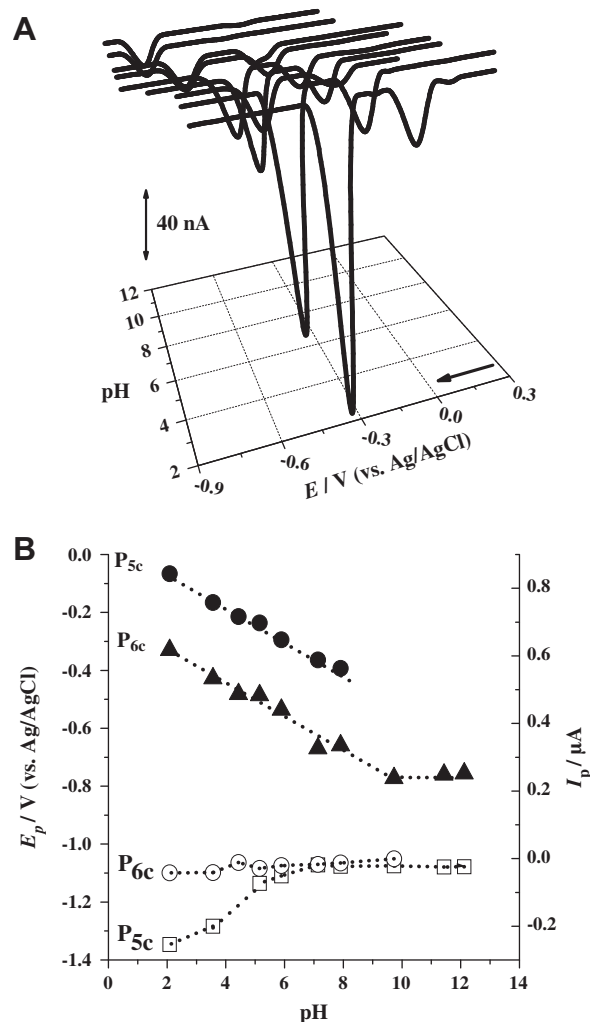
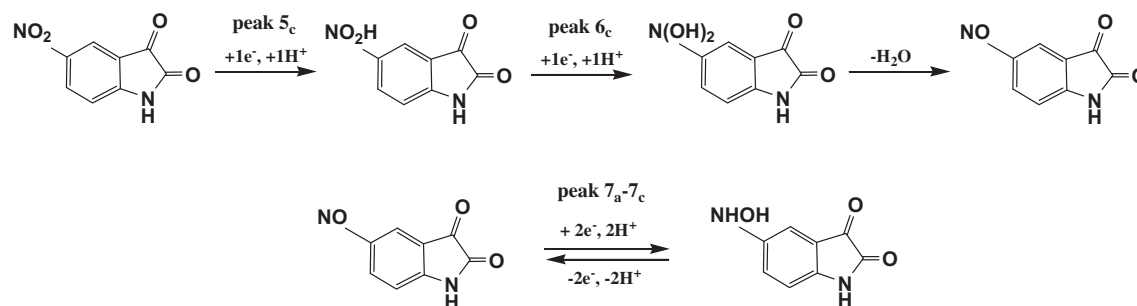


Fig. 7. (A) 3D plot of reduction DP voltammograms baseline corrected in 20 μ M 5-nitroisatin vs. pH. (B) Plot of peak 5_c (●) E_{p5c} and (○) I_{p5c} , and of peak 6_c (▲) E_{p6c} and (□) I_{p6c} vs. pH.



Scheme 4. Proposed reduction mechanism of 5-nitroisatin.

by the peak width at half height $W_{1/2} \sim 82$ mV, corresponding to an electrochemical reaction involving the transfer of one electron. For $\text{pH} \geq 10.0$, the reduction peak 6_c is pH-independent indicating a mechanism involving only one electron, Fig. 7A. The value of $\text{p}K_a \sim 10$ for 5-nitroisatin was determined from data in Fig. 7B.

Successive DP voltammograms in 5-nitroisatin in the potential range 0.0 V till -0.4 V, showed only peak 5_c , at $E_{p5c} = -0.4$ V. In the second scan no electroactive reduction product was detected. However, these experiments were repeated in the potential range 0.0 V till -1.2 V and in the first scan two reduction peaks, peak 5_c , at $E_{p5c} = -0.40$ V and the peak 6_c , at $E_{p6c} = -0.77$ V, were observed. In the second scan one new peak 7_c , at $E_{p7c} = -0.11$ V, occurred related to the products formed in peak 6_c . This confirms that the reduction was associated with the nitro group since the product of reduction of isatin is not electroactive. A mechanism for the reduction of 5-nitroisatin is proposed [37,41], Scheme 4.

The two reduction steps, peaks 5_c and 6_c , produce 5-nitrosoisatin, Scheme 4, and the oxidation of the 5-hydroxylamineisatin to the 5-nitrosoisatin is a reversible process involving two electrons and two protons, peaks 7_a-7_c , Fig. 3A, was observed and is concluded that the high negative potential applied reduced the 5-nitrosoisatin to 5-hydroxylamineisatin.

4. Conclusions

The electrochemical behaviour of a group of isatin derivatives, with a large spectrum in clinical application, was studied by CV, SW and DP voltammetry over a wide pH range using a GCE. The results showed that the hydrazone, semicarbazone and nitro groups attached to the isatin ring structure give rise to different and separate oxidation and reduction mechanisms and these derivatives presented new redox properties when compared with the isatin. The electrochemical results demonstrated that the hydrazone and semicarbazone groups increased the electron-donor character while the nitro group increased the electron acceptor character of isatin.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Post-Doctoral Grant SFRH/BPD/71965/2010 (S.C.B. Oliveira), BTID Grant (I.P.G. Fernandes), Project PTDC/QUI-QUI/098562/2008, POPH, POFC-QREN (co-financed by the European Community Funds FSE and FEDER/COMPETE), and CEMUC-R (Research Unit 285), is gratefully acknowledged.

References

- [1] M. Ischia, A. Palumbo, G. Prota, *Tetrahedron* 44 (1988) 6441.
- [2] M. Farghaly, B.F. Abdel-Wahab, E.M. Ahmed, *Chem. Heterocycl. Comp.* 45 (2009) 539.
- [3] J.F.M. Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 273.
- [4] V. Glover, S.K. Bhattacharya, A. Chakrabarti, M. Sandler, *Stress Med.* 14 (1998) 225.
- [5] V. Glover, M.A. Revely, M. Sandler, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 467.
- [6] A.E. Medvedev, A. Clow, M. Sandler, V. Glover, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 385.
- [7] A.E. Medvedev, O. Bussygyna, N. Pyatakova, N. Glover, I. Severina, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 763.
- [8] P. Watkins, A. Clow, V. Glover, J. Halket, A. Przyborowska, M. Sandler, *Neurochem. Int.* 17 (1990) 321.
- [9] A. Medvedev, M. Cromeyrolle-Arias, A. Cardona, M. Sandler, V. Glover, *Brain Res.* 1024 (2005) 119.
- [10] M.G.A. Shvekhgeimer, *Chem. Heterocycl. Compd.* 32 (1996) 249.
- [11] S.J. Shuttleworth, D. Nasturica, C. Gervais, M.A. Siddiqui, R.F. Rando, N. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 2501.
- [12] S.K. Sridhar, M. Saravanan, A. Ramesh, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 615.
- [13] H. Adibi, M.M. Khodaei, P. Pakravan, R. Abiri, *Pharm. Chem. J.* 44 (2000) 219.
- [14] S. Rollas, S.G. Kuçukguzel, *Molecules* 12 (2007) 1910.
- [15] S.N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S.K. Sridha, *Acta Pharm.* 55 (2005) 27.
- [16] G. Pelosi et al., *Acta Crystallogr. C* 61 (2005) 589.
- [17] A.B. Tomchin, I.L. Zhmykhova, M.M. Ponomareva, L.G. Pastushenkov, É.G. Gromova, *Pharm. Chem. J.* 20 (1986) 619.
- [18] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications ed., Oxford, 1993.
- [19] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1633.
- [20] S.C.B. Oliveira, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 20 (2008) 2429.
- [21] H. Shirinzadeh et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen* 13 (2010) 619.
- [22] R. Andruzzi, M.E. Cardinali, A. Trazza, *Electrochim. Acta* 17 (1972) 1524.
- [23] A.K. Gupta, R.S. Sindal, *J. Chem. Soc.* 121 (2009) 347.
- [24] G. Farnia, G. Capobianco, A. Romanin, *J. Electroanal. Chem.* 45 (1973) 397.
- [25] V.C. Diculescu, S. Kumbhat, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 190.
- [26] Y. Lai, L. Mab, W. Huang, X. Yu, Y. Zhang, H. Ji, J. Tian, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 7349.
- [27] L. Zhou, Y. Liu, W. Zhang, P. Wei, C. Huang, J. Pei, Y. Yuan, L. Lai, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3440.
- [28] H.O. Calvery, C.R. Noller, R. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* 47 (1925) 3058.
- [29] T. Sandmeyer, *Helv. Chim. Acta* 2 (1919) 234.
- [30] N.M. da Silva, R.S. Bastos, B.V. Silva, A.C. Pinto, *Quim. Nova* 33 (2010) 2279.
- [31] R. Beynon, J. Easterby, *The Basics Buffer Solutions*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [32] A.S. Al-Ayed et al., *J. Colloid. Int. Sci.* 357 (2011) 393.
- [33] J.P. Stables, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5 (2002) 266.
- [34] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9.
- [35] I.P.G. Fernandes, S.C.B. Oliveira, M. Ghalkhani, S. Shahrokhian, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 24 (2012) 618.
- [36] H. Lund, O. Hammerich (Eds.), *Organic Electrochemistry*, fourth ed., Marcel Dekker, New York, 2001.
- [37] E.C. Lin, M.R.V. De Mark, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1982) 1176.
- [38] B. Lotfi, B. Mustafa, B. Leila, M. Salima, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 1991.
- [39] O. Hammerich, V.D.J. Parker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1972) 1718.
- [40] M.S. Baymak, H. Celik, H. Lund, P. Zuman, *J. Electroanal. Chem.* 589 (2006) 7.
- [41] Y.P. Li, H.B. Cao, C.M. Liu, Y. Zhang, *J. Harzard. Mater.* 148 (2007) 158.



Isatin halogen-derivatives redox behaviour



Isabel P.G. Fernandes^a, Bárbara V. Silva^b, Bianca N.M. Silva^b, Angelo C. Pinto^b,
S. Carlos B. Oliveira^{a,c}, Ana Maria Oliveira-Brett^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

^b Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21945-970 Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2016

Received in revised form 1 September 2016

Accepted 5 September 2016

Available online 7 September 2016

Keywords:

Isatin derivatives

Halogens

Redox behaviour

Glassy carbon

Voltammetry

ABSTRACT

Isatin halogen-derivatives like other isatin derivatives have several pharmacotherapeutic applications, such as antibacterial, antitubercular, and anticancer activities. The electrochemical behaviour, at a glassy carbon electrode, of some mono- and di- fluoro, chloro, bromo and iodo isatin derivatives, by cyclic, square wave and differential pulse voltammetry, over a wide pH range, was investigated, and compared with isatin electrochemical behaviour. The presence of one or two halogens in the benzene ring affected the oxidation processes. The oxidation mechanism of isatin monohalogen-derivatives, with only one halogen at the position C5 or C7, was an irreversible, pH-dependent, adsorption-controlled process, and occurred in three consecutive charge transfer reactions, first on the benzene ring with the production of one hydroxyl group attached to the ring, and the electroactive oxidation product formed was oxidized to *para*- and/or *ortho*-quinone derivatives and polymeric products. The isatin dihalogen-derivatives oxidation was also irreversible, in two consecutive charge transfer reactions, with the formation of polymeric products, and occurred at more positive potentials. The reduction mechanism of isatin halogen-derivatives was a pH-dependent two consecutive charge transfer reactions. The first process was the reversible reduction of the carbon-halogen bond and the second the irreversible cleavage of the carbonyl group at the position C3 in the heterocyclic ring. The halogens substituents in the isatin benzene ring gave rise to different redox processes, depending on the number and halogen position.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Isatin (1*H*-indole-2,3-dione) (ISA), one of the most important derivatives of indole, is an endogenous compound identified in many organisms, present in mammalian tissues and body fluids, and also as a natural product of plants, for example genus *Isatis*, in *Calanthe discolor*, Lindl, and in *Couroupita guianensis*, Aubl [1–3].

Isatin is a very important molecule due to its broad range of biological and pharmacological properties, and also because it is a synthetically versatile substrate. Isatin and its derivatives are extensively used as important raw materials for designing potential bioactive agents [3–5]. Recently the study of isatin derivatives have been shown to demonstrate antiprotozoal, antibacterial, antifungal, antiviral, *anti*-HIV, anti-convulsant, antitumoral, anti-inflammatory, antihelminthic activities, to influence neurodegenerative diseases, and to participate in metabolism [3,6–8].

Isatin halogen-derivatives have also been reported to exhibit several pharmacotherapeutic activities, such as antibacterial, antitubercular, anticancer and antineoplastic activities [9–20].

Isatin fluoro-derivatives are used in the synthesis of new compounds that may belong to a class of chemotherapeutic agents for the treatment of various bacterial infections, act by inhibiting DNA gyrase, the principal target in gram-negative bacteria, and also the topoisomerase IV, the principal target in gram-positive bacteria [13]. The isatin 5-fluoro-derivatives were also synthesized and the antitubercular activity was evaluated and some of the compounds presented complete inhibition against the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain [14]. In 2006, an isatin 5-fluoro-derivative (sunitinib) was approved by FDA for the treatment of gastrointestinal stromal tumours and advanced renal cell carcinoma [15–16].

Isatin bromo-derivatives have been shown to exhibit anticancer activity [17–19]. The *in vitro* cytotoxic activities of isatin bromo-derivatives were determined against the human monocyte-like, histiocytic lymphoma cell line (U937), showing that the introduction of electron-withdrawing groups at positions C5, C6, and C7 significantly increased the anticancer activity when compared with isatin, the substitution at the 5-position being the most favourable [18]. The C5 substitution in the isatin ring has been associated with increased biological activity for a range of indole-based compounds [18]. Both chloro and bromo substituted isatin derivatives presented antifungal and antibacterial activity but the isatin 5-chloro-derivatives, when compared with the

* Corresponding author.

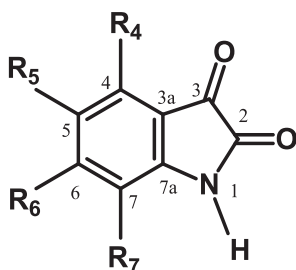
E-mail address: brett@ci.uc.pt (A.M. Oliveira-Brett).

isatin 5-bromo-derivatives presented a better antibacterial activity [21]. The 5-chloro-isatin ketals, such as the dioxolane ketal of 5-chloro-isatin, have significant anticonvulsant and anxiolytic activities [22].

Electrochemical techniques have been widely used to study the structure, reactivity and mechanism of action of pharmaceutical and biological compounds. Also, other parameters can be evaluated using electrochemical data, such as stereochemistry, diffusion, solubility and metabolism. It should be considered that many physiological processes are depending on redox reactions, and it is easy to find complementary electrochemical and biological reactions, providing useful information on the mechanism of the compounds in living systems. These reactions are most often studied with electrochemical techniques, cyclic, square wave and differential pulse voltammetry, since they have high sensitivity and selectivity [23–27].

There are some studies concerning the redox behaviour of isatin and of its derivatives in aqueous and non-aqueous media, using voltammetry at glassy carbon or mercury electrodes [28–33]. Since isatin halogen-derivatives, in general, are having increasing applications in the synthesis of new molecules with pharmaceutical interest, the investigation of their in vitro redox behaviour is very important in order to predict the in vivo redox reactions.

The aim of the present study is focused on the redox behaviour of a series of eleven isatin mono- and dihalogen-derivatives, Scheme 1. The influence of the number and halogen atoms (F, Cl, Br and I), substituents in the isatin benzene ring, in the redox properties, for a wide range of solution conditions, using cyclic, square wave and differential pulse voltammetry at a glassy carbon electrode, was investigated and a redox mechanism proposed.



Compound	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
ISA	H	H	H	H
5-F-ISA	H	F	H	H
5-Cl-ISA	H	Cl	H	H
5-Br-ISA	H	Br	H	H
5-I-ISA	H	I	H	H
7-Cl-ISA	H	H	H	Cl
7-I-ISA	H	H	H	I
4,6-Br-ISA	Br	H	Br	H
5,7-diCl-ISA	H	Cl	H	Cl
5,7-diBr-ISA	H	Br	H	Br
5,7-F-Cl-ISA	H	F	H	Cl
5,7-Br-Cl-ISA	H	Br	H	Cl

Scheme 1. Chemical structures of isatin and isatin halogen-derivatives.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

The isatin and all isatin halogen-derivatives were synthesized according to methods described in the literature [5,34–37], Scheme 1. Stock solutions of isatin and all isatin halogen-derivatives, with a concentration of 1 mM, in ethanol, were prepared and stored at 4 °C.

Supporting electrolyte solutions, with ionic strength $I = 0.1$ M, of different pH composition: pH 2.0 (HCl + KCl), pH 3.3 (HOAc + NaOAc), pH 4.5 (HOAc + NaOAc), pH 5.2 (HOAc + NaOAc), pH 5.9 (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄), pH 7.2 (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄), pH 8.0 (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄), pH 9.2 (NaOH + Na₂B₂O₇), pH 11.2 (NaOH + Na₂HPO₄), using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity ≤ 0.1 μ S cm⁻¹) according to the literature, were prepared [38].

Nitrogen saturated solutions were obtained by bubbling high purity N₂ for a minimum of 10 min in the solution, and continuing with a N₂ flow over the solution during the voltammetric experiments.

Microvolumes were measured using electronic pipettes (EP), EP-10 μ M and EP-100 μ M Plus Motorized (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode.

All experiments were done at room temperature, $T = 298$ K (25 °C).

2.2. Voltammetric parameters and electrochemical cells

Voltammetric experiments were carried out using a μ Autolab running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a glassy carbon working electrode (GCE) ($d = 1.5$ mm), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 1 mL one-compartment electrochemical cell (eDAQ Europe). The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were scan rate 100 mV s⁻¹, and for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, and scan rate 5 mV s⁻¹. For square wave (SW) voltammetry the experimental conditions were frequency 25 Hz and potential increment 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 50 mV s⁻¹.

The GCE was polished using diamond spray (particle size 1 μ m, Kement, Kent, UK) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and various DP voltammograms were recorded until a steady state baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

2.3. Acquisition and presentation of voltammetric data

All DP Voltammograms presented were baseline-corrected using the moving average application with a step window of 2 mV included in the GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak current is in some cases reduced (<10%) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original DP voltammograms was used in the presentation of all experimental DP voltammograms for a better and clearer identification of the peaks.

3. Results and discussion

Initial studies concerning the voltammetric behaviour of eleven isatin halogen-derivatives, Scheme 1, with substituents at C4, C5, C6 or C7 positions, were carried out in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, N₂ saturated solutions, in 200 μ M isatin halogen-derivatives, by CV, scan rate 100 mV s⁻¹, at a GCE. During the voltammetric measurement

a constant flux of N_2 was kept over the solution surface in order to avoid the diffusion of atmospheric oxygen into the solutions.

All isatin halogen-derivatives were electroactive and some oxidation and reduction peaks occurred, Figs. 1 and 2, Tables 1 and 2. Nevertheless, the reduction and the oxidation mechanisms for all eleven isatin halogen-derivatives were independent of each other, so they were investigated separately.

3.1. Oxidation

The oxidation of isatin and eleven isatin halogen-derivatives was investigated by CV, and the oxidation of 5-F-ISA and 7-I-ISA, by DP and SW voltammetry, was also investigated.

3.1.1. Cyclic voltammetry

CV experiments, at GCE, in the potential range 0.0 V till +1.3 V, in physiological 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, containing 500 μ M of isatin and 200 μ M isatin halogen-derivatives, Scheme 1, Figs. 1 and 2, and Table 1, were carried out to study the influence of the halogen substituent(s) on the electrochemical oxidation of isatin.

In general, the CVs obtained in 200 μ M solutions of all isatin halogen-derivatives showed the occurrence of two consecutive irreversible oxidation peaks 1a and 2a, Figs. 1 and 2, and Table 1. However, the presence of one or two halogens in the benzene ring considerably affected the oxidation process.

The isatin monohalogen-derivatives, 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA and 7-I-ISA, Scheme 1, anodic peaks 1a and 2a occurred at less positive potentials and, when compared with the 5-Br-ISA, 5-I-ISA and isatin dihalogen-derivatives oxidation behaviour, a new oxidation process, peak 3a, was detected, Figs. 1 and 2, and Table 1.

3.1.1.1. Isatin monohalogen-derivatives. CVs obtained in the supporting electrolyte 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, and in solutions of 200 μ M 5 (or 7)-(Cl, Br, I)-isatins, are presented in Fig. 1 and Table 1.

CVs in 200 μ M 5-fluoro-isatin (5-F-ISA), in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, Fig. 3, presented three irreversible oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.62$ V, peak 2a, at $E_{p2a} = +1.01$ V, and peak 3a, at $E_{p3a} =$

+1.20 V. Successive scans recorded in the same solution, without cleaning the electrode surface, showed a decrease of the oxidation peak current of the three anodic peaks 1a, 2a and 3a, due to the adsorption of 5-F-ISA oxidation products on the GCE surface.

CVs were also obtained for different scan rates. Increasing the scan rate, the peak 1a current also increased. However, it was not a diffusion-controlled oxidation process because there was not a linear relationship between I_{pa} of peak 1a and the square root of the scan rate [23]. This is explained taking into consideration the strong adsorption of 5-F-ISA molecules on the hydrophobic GCE surface, in agreement with the highly hydrophobic character of isatin [33].

The oxidation of isatin monohalogen-derivatives led, in general, to the appearance of three anodic oxidation peaks and a decrease in the peak currents, when successive scans were recorded, showing the same behaviour when compared with the 5-F-ISA, and the isatin monohalogen-derivatives, at *ortho*- or *para*-halogen substituent positions, have the same oxidation mechanism. However, in the electrooxidation of 5-Br-ISA and 5-I-ISA, only two anodic peaks were detected in agreement with ISA oxidation [31].

3.1.1.2. Isatin dihalogen-derivatives. CVs obtained in the supporting electrolyte, and in solutions of 200 μ M of isatin dihalogen-derivatives, 4,6-diBr-ISA, 5,7-diCl-ISA, 5,7-diBr-ISA, 5,7-F-Cl-ISA, 5,7-Br-Cl-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, are presented in Fig. 2 and Table 1.

The isatin dihalogen substitution caused the appearance of only two anodic oxidation peaks and a decrease in the peak currents when successive scans were recorded, showing the same behaviour when compared with non-substituted ISA, Fig. 2A.

The isatin dihalogen-derivatives oxidation potentials depended on the nature and position of the halogen atoms in the ring:

5,7-diCl-ISA > 5,7-F-Cl-ISA > 4,6-diBr-ISA > 5,7-Br-Cl-ISA > 5,7-diBr-ISA.

as the presence of the second halogen atom in the benzene ring hampered, as expected, the isatin dihalogen-derivatives oxidation processes, when compared to the isatin monohalogen-derivatives, Figs. 1 and 2 and Tables 1 and 2.

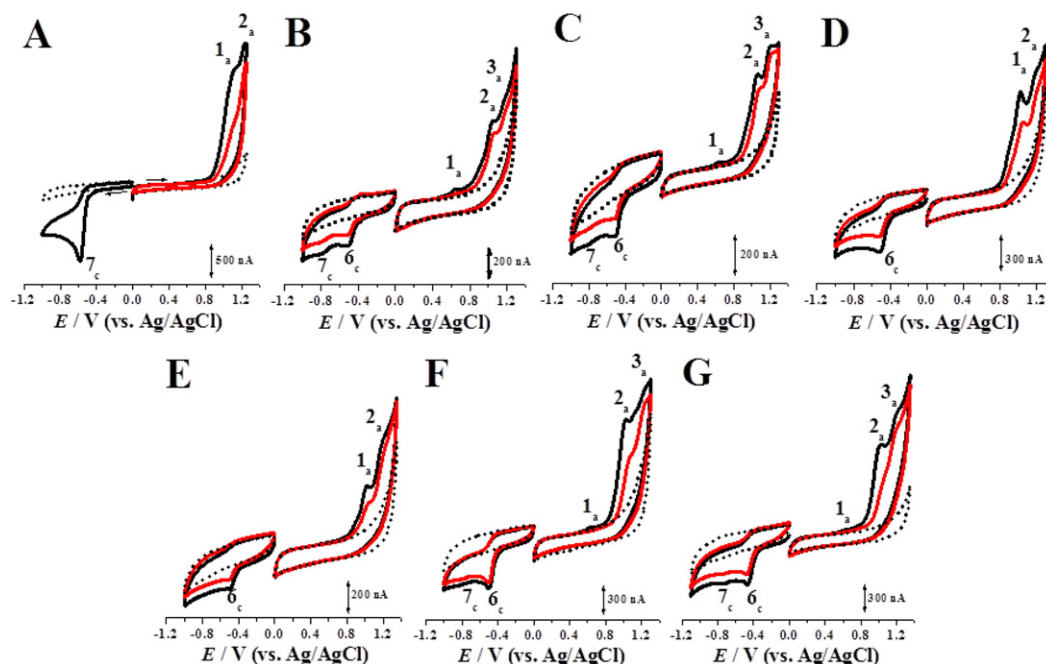


Fig. 1. CVs in N_2 saturated supporting electrolyte (***), 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0: (A) 500 μ M ISA and 200 μ M isatin monohalogen-derivatives: (B) 5-F-ISA, (C) 5-Cl-ISA, (D) 5-Br-ISA, (E) 5-I-ISA, (F) 7-Cl-ISA and (G) 7-I-ISA, (—) first and (---) second scans, $v = 100$ $mV s^{-1}$.

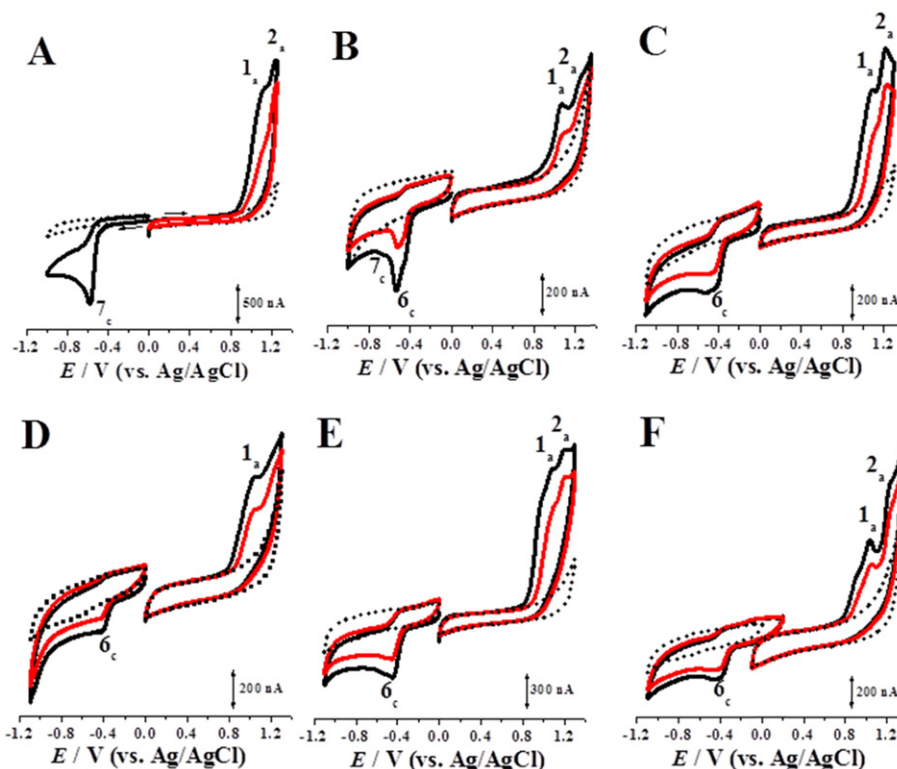


Fig. 2. CVs in N_2 saturated supporting electrolyte (•••) 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0: (A) 500 μ M ISA and 200 μ M isatin dihalogen-derivatives: (B) 4,6-Br-ISA, (C) 5,7-diCl-ISA, (D) 5,7-diBr-ISA, (E) 5,7-F-Cl-ISA, and (F) 5,7-Br-Cl-ISA, (—) first and (—) second scans, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Table 1
Isatin halogen-derivatives oxidation potentials obtained by CV, pH = 7.0.

Isatin halogen-derivatives oxidation	Potential/V (vs. Ag/AgCl)	
	Scan 1	Scan 2
ISA	$E_{p1a} = +1.10 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.24 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.16 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.20 \text{ V}$
5-F-ISA	$E_{p1a} = +0.64 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.03 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.17 \text{ V}$	$E_{p1a} = +0.66 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.00 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.16 \text{ V}$
5-Cl-ISA	$E_{p1a} = +0.63 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.06 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.20 \text{ V}$	$E_{p2a} = +1.07 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.21 \text{ V}$ $E_{p1a} = +1.04 \text{ V}$
5-Br-ISA	$E_{p1a} = +1.02 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.18 \text{ V}$	$E_{p2a} = +1.20 \text{ V}$
5-I-ISA	$E_{p1a} = +1.03 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.18 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.03 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.20 \text{ V}$
7-Cl-ISA	$E_{p1a} = +0.62 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.02 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.23 \text{ V}$	$E_{p2a} = +1.06 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.23 \text{ V}$
7-I-ISA	$E_{p1a} = +0.62 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.01 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.20 \text{ V}$	$E_{p2a} = +1.04 \text{ V}$ $E_{p3a} = +1.18 \text{ V}$
4,6-diBr-ISA	$E_{p1a} = +1.06 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.25 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.07 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.25 \text{ V}$
5,7-diCl-ISA	$E_{p1a} = +1.07 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.21 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.09 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.22 \text{ V}$
5,7-diBr-ISA	$E_{p1a} = +1.03 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.03 \text{ V}$
5,7-F-Cl-ISA	$E_{p1a} = +1.08 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.20 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.09 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.20 \text{ V}$
5,7-Br-Cl-ISA	$E_{p1a} = +1.03 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.22 \text{ V}$	$E_{p1a} = +1.04 \text{ V}$ $E_{p2a} = +1.23 \text{ V}$

3.1.2. Differential pulse voltammetry

Successive DP voltammograms were recorded in a solution of 20 μ M of 5-F-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0. Fig. 4A and Table 3. In the first DP voltammogram oxidation peak 1a, at $E_{p1a} = +0.62 \text{ V}$, peak 2a, at $E_{p2a} = +1.04 \text{ V}$, and peak 3a, at $E_{p3a} = +1.16 \text{ V}$, occurred. In the second DP voltammogram, two new peaks were detected, peak 4a, at $E_{p4a} = +0.18 \text{ V}$, and peak 5a, at $E_{p5a} = +0.39 \text{ V}$, and both peak currents increased with the number of scans.

Table 2
Isatin halogen-derivatives reduction potentials obtained by CV, pH = 7.0.

Isatin halogen-derivatives reduction	Potential/V (vs. Ag/AgCl)	
	Scan 1	Scan 2
ISA	$E_{p7c} = -0.58 \text{ V}$	$E_{p7c} = -0.60 \text{ V}$
5-F-ISA	$E_{p6c} = -0.50 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.78 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.78 \text{ V}$
5-Cl-ISA	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.80 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$
5-Br-ISA	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.52 \text{ V}$
5-I-ISA	$E_{p6c} = -0.49 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.49 \text{ V}$
7-Cl-ISA	$E_{p6c} = -0.49 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.50 \text{ V}$
7-I-ISA	$E_{p6c} = -0.47 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.74 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.48 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.73 \text{ V}$
4,6-diBr-ISA	$E_{p6c} = -0.53 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.67 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$ $E_{p7c} = -0.67 \text{ V}$
5,7-diCl-ISA	$E_{p6c} = -0.52 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.51 \text{ V}$
5,7-diBr-ISA	$E_{p6c} = -0.40 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.41 \text{ V}$
5,7-F-Cl-ISA	$E_{p6c} = -0.48 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.48 \text{ V}$
5,7-Br-Cl-ISA	$E_{p6c} = -0.42 \text{ V}$	$E_{p6c} = -0.47 \text{ V}$

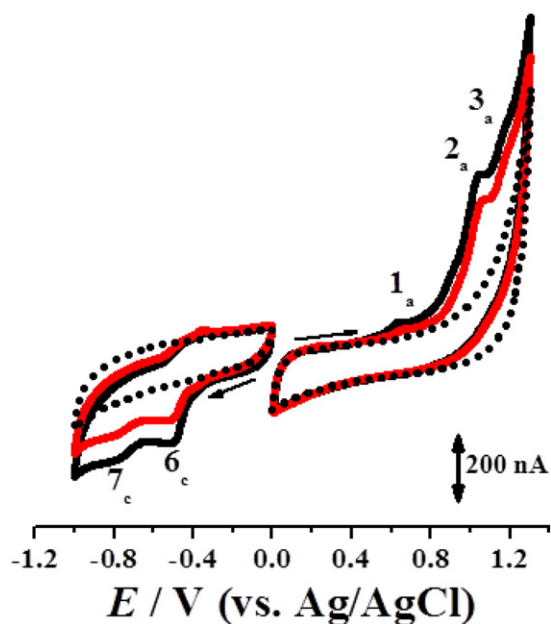


Fig. 3. CVs in N_2 saturated supporting electrolyte (•••) 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, of 200 μM 5-F-ISA, (—) first and (—) second scans, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

In a new experiment, with a clean GCE, in 50 μM 5-F-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, two successive DP voltammograms, were performed. The first DP voltammogram was scanned just until before peak 2a, and in the second DP voltammogram the peaks 4a and 5a were not detected, Fig. 4B.

This experiment was repeated again, with a clean GCE, and again two successive DP voltammograms were performed. The first DP voltammogram was scanned just until before peak 3a, and in the second DP voltammogram the peaks 4a and 5a appeared, Fig. 4C. Consequently, the peaks 4a and 5a were undoubtedly assigned to the 5-F-ISA oxidation products formed in the 5-F-ISA peak 2a oxidation process.

The effect of pH on the electrochemical oxidation of lower concentrations 20 μM 5-F-ISA, using DP voltammetry, at a GCE, in different electrolytes 0.1 M ionic strength, over a wide range $2.0 < \text{pH} < 11$, was investigated.

For $2.0 < \text{pH} < 9.0$ the potential of all three anodic peaks 1a, 2a and 3a were shifted to more negative values with increasing pH, Fig. 5A and B. In the E_{pa} vs. pH plot, Fig. 5B, the slope of the dotted line, -59 mV per pH unit, showed that the mechanism of all oxidation processes involved the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred n , was determined by the peak width at half height, $W_{1/2} \approx 70 \text{ mV}$ for peak 1a, $W_{1/2} \approx 93 \text{ mV}$ for peak 2a, and $W_{1/2} \approx 65 \text{ mV}$ for peak 3a, each corresponding to the electrochemical oxidation reaction involving the transfer of one electron and one proton. Therefore, 5-F-ISA was oxidized in three successive steps and with one-electron and one-proton transfer in each step. The plot of peaks 1a, 2a and 3a current vs. pH, Fig. 5A, showed that 5-F-ISA peak currents were much higher for $3.0 \leq \text{pH} < 7.0$. So, it is demonstrated that the 5-F-ISA oxidation is significantly affected by the pH. Consequently, it is important to consider the 5-F-ISA and the 5-F-ISA oxidation products predominant form at each pH which means structural changes, for example, in the phenolic groups, Scheme 2, due to its acid-base equilibrium and variations on the hydrophilic character, strongly influencing, as expected, the 5-F-ISA electrooxidation process (peak potentials and currents) on the GCE surface.

For $\text{pH} > 9.0$, the oxidation peak 1a was pH-independent corresponding to an electrochemical reaction involving one electron transfer. The investigation in different pH environments allowed the determination for 5-F-ISA of $\text{pK}_a \sim 9$ from the data in Fig. 5B.

The strong adsorption of 5-F-ISA and its oxidation products at the GCE surface was investigated for different pHs 3.5, 6.9 and 9.0. The

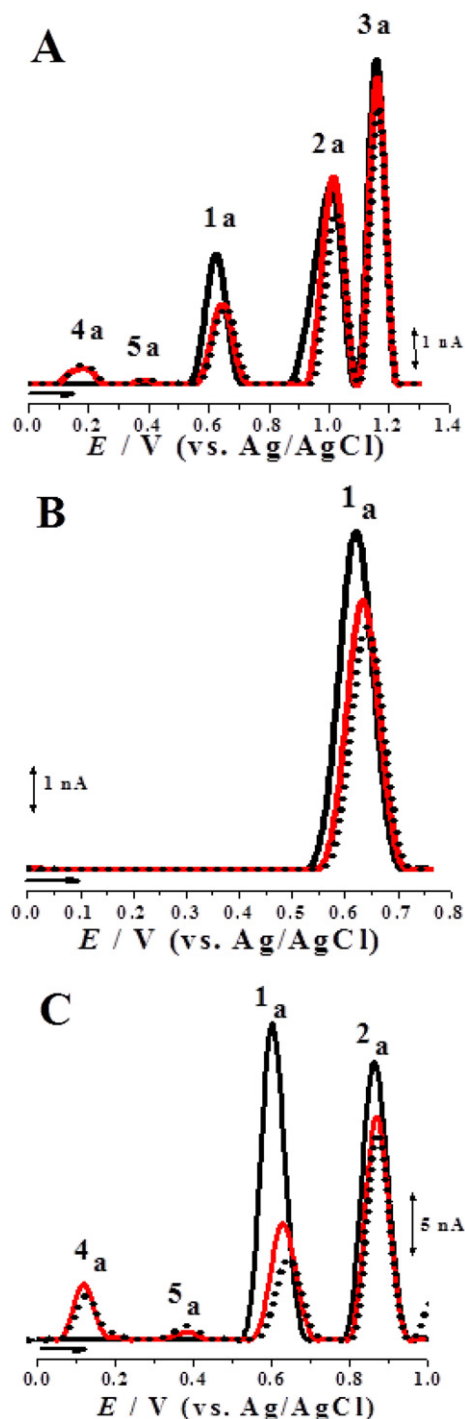


Fig. 4. Successive DP voltammograms, in three different potential windows, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0 of 5-F-ISA: (A) 20 μM and (B-C) 50 μM , (•••) first, (—) second and (—) third scan, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

electrode was immersed for 10 min in a 20 μM 5-F-ISA solution, in each pH, and after the electrode was washed with a jet of deionized water and transferred to the buffer electrolyte solution. The strong adsorption on GCE in acid and neutral media was confirmed because peaks 1a, 3a and 4a, appeared in acid electrolyte solution, in neutral electrolyte solution only peak 1a occurred, and for pH 9.0 no peaks were found.

The DP voltammograms recorded in a solution of 20 μM 7-I-ISA also showed an oxidation process with three irreversible pH-dependent oxidation steps, peak 1a, at $E_{\text{p1a}} = +0.60 \text{ V}$, peak 2a, at $E_{\text{p2a}} = +0.88 \text{ V}$, and peak 3a, at $E_{\text{p3a}} = +1.17 \text{ V}$.

Table 3
Oxidation potentials of 5-F-ISA and 7-I-ISA obtained by DP voltammetry, pH = 7.0.

Oxidation	Potential/V (vs. Ag/AgCl)	
	Scan 1	Scan 2
5-F-ISA	$E_{p1a} = +0.62$ V	$E_{p4a} = +0.18$ V
	$E_{p2a} = +1.04$ V	$E_{p5a} = +0.39$ V
	$E_{p3a} = +1.16$ V	$E_{p1a} = +0.65$ V
		$E_{p2a} = +1.02$ V
		$E_{p3a} = +1.16$ V
7-I-ISA	$E_{p1a} = +0.60$ V	$E_{p4a} = +0.23$ V
	$E_{p2a} = +0.88$ V	$E_{p1a} = +0.63$ V
	$E_{p3a} = +1.17$ V	$E_{p2a} = +0.91$ V
		$E_{p3a} = +1.16$ V

For $3.0 < \text{pH} < 9.0$ the potential of both peaks 1a and 2a were shifted to more negative values with increasing pH. In the E_{pa} vs. pH plot the slope of the dotted line, -59 mV per pH unit, showed that the mechanism of both oxidation processes involved the same number of electrons and protons. The number of electrons transferred n , was determined by the peak width at half height, $W_{1/2} \approx 70$ mV for peak 1a, and $W_{1/2} \approx 87$ mV for peak 2a, close to the theoretical value of 90 mV, both peaks oxidation reaction involving the transfer of one electron and one proton. For $\text{pH} > 8$, the oxidation peaks 1a and 2a were pH-independent, corresponding to an electrochemical reaction involving

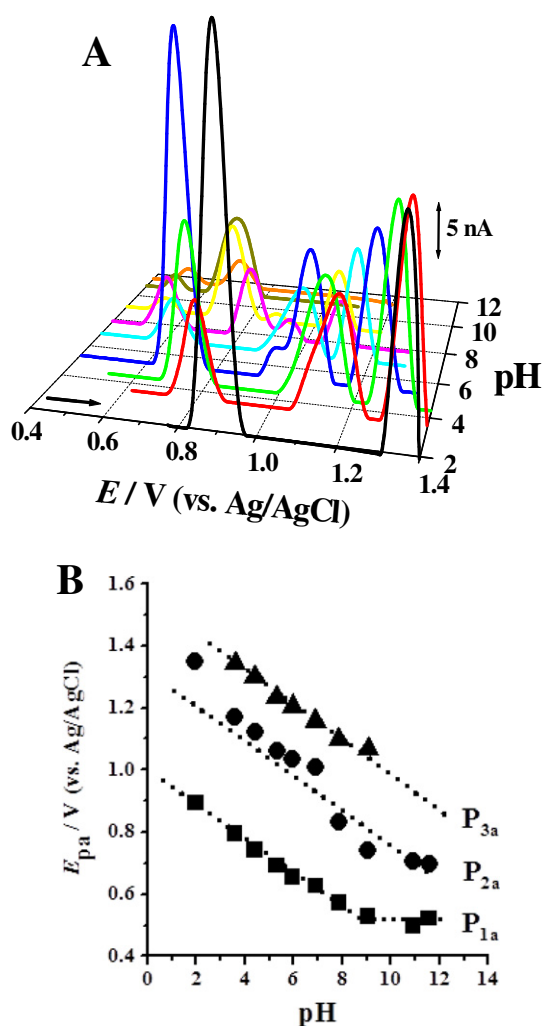


Fig. 5. (A) 3D plot of oxidation DP voltammograms in $20 \mu\text{M}$ 5-F-ISA vs. pH, (■) pH = 2, (—) pH = 3.58, (—) pH = 4.4, (—) pH = 5.3, (—) pH = 7.0, (—) pH = 8.0, (—) pH = 9.0, (—) pH = 11.0 and (—) pH = 11.56. (B) Plot of (■) E_{p1a} of peak 1a, (●) E_{p2a} of peak 2a, and (▲) E_{p3a} of peak 3a vs. pH. The slope of the line is 59 mV per pH unit.

the transfer of one electron. The value of $\text{pKa} \sim 8$ for 7-I-ISA was determined.

Successive DP voltammograms recorded in $20 \mu\text{M}$ 7-I-ISA showed a similar behaviour to 5-F-ISA. However, in the second DP voltammogram the peaks current increased with the number of scans, and only one new peak 4a, at $E_{p4a} = +0.23$ V, corresponding to the oxidation of 7-I-ISA oxidation products, formed at the GCE surface after the first positive-going cycle, occurred Table 3.

3.1.3. Square wave voltammetry

One of the most important advantages of SW voltammetry is the possibility to verify the reversibility of the electron transfer reaction during only one scan. Since the current is sampled in both positive and negative-going pulses, peaks corresponding to the oxidation and reduction of the electroactive species at the electrode surface can be obtained in the same scan. Other advantages are greater speed of analysis, lower consumption of the electroactive species in relation with DP voltammetry and reduced problems with the adsorption on the GCE surface [23]. The SW voltammetry experiments enabled to confirm the oxidation mechanisms of 5-F-ISA and 5-I-ISA.

The first SW voltammogram in $20 \mu\text{M}$ 5-F-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, showed two oxidation steps, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.64$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} = +1.03$ V, Fig. 6A. The irreversibility of 5-F-ISA peaks 1a and 2a was confirmed by plotting the forward and backward components of the total current, Fig. 6A. The anodic peak 3a occurred at very high positive potential, near the potential corresponding to oxygen evolution, and consequently was not detected by SW voltammetry. The second SW voltammogram showed the occurrence of reversible peak 4a, at $E_{p4a} = +0.19$ V, and reversible peak 5a, at $E_{p1a} = +0.34$ V, corresponding to the 5-F-ISA oxidation products reversible oxidation, Fig. 6B.

The first SW voltammogram, in $20 \mu\text{M}$ 5-I-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, showed two oxidation steps, peak 1a, at $E_{p1a} = +0.64$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} = +1.03$ V. In the first SW voltammogram the irreversibility of 7-I-ISA peaks 1a and 2a was also confirmed, and the third SW voltammogram showed the occurrence of the reversible peak 4a, at $E_{p4a} = +0.27$ V, corresponding to the 7-I-ISA oxidation product reversible oxidation, Fig. 6C and D.

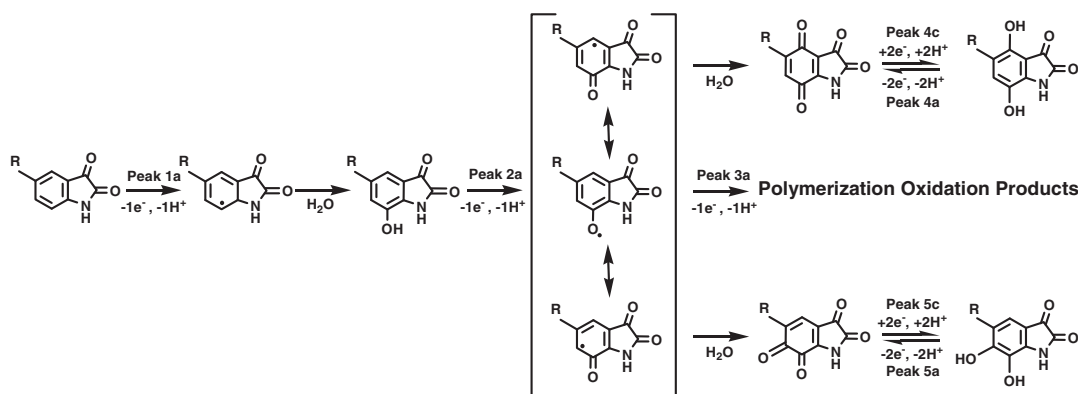
3.1.4. Oxidation mechanism of isatin halogen-derivatives

The oxidation of isatin halogen-derivatives with different halogen substituents, such as fluorine, chlorine, bromine and iodine, attached to the isatin ring structure, Scheme 1, followed in general a similar oxidation processes. The oxidation mechanism, in physiological pH = 7.0, based on CV, DP and SW voltammetry, is proposed in Scheme 2.

In order to propose the oxidation mechanism of the isatin halogen-derivatives, the oxidation mechanism of isatin [31,33] and phenolic compounds [33,39–45], was revisited.

The oxidation of all isatin halogen-derivatives proceeded in successive steps on the benzene ring, and was influenced by the halogen number and position in the isatin molecule, and some isatin halogen-derivatives oxidation products were electroactive. To simplify the analysis of the oxidation mechanisms, the isatin halogen-derivatives according to the halogen number and position in the molecule, isatin 5 (or 7)-monohalogen-derivatives and isatin dihalogen-derivatives, were considered separately.

3.1.4.1. Isatin 5 (or 7)-monohalogen-derivatives. The oxidation reactions in isatin 5 (or 7)-monohalogen-derivatives proceeded in three successive steps on the benzene ring. In the first step, peak 1a, one electron was removed from the benzene ring, following deprotonation and direct nucleophilic attack by water with the production of the 7-hydroxy-5-monohalogen-isatin or 4-hydroxy-7-monohalogen-isatin. The second step, peak 2a, corresponded to the oxidation of the 7 (or 4)-OH group, produced in the first oxidation step, with the production of the peak 4a, *para*-quinone derivative, and peak 5a, *ortho*-quinone



Scheme 2. Proposed oxidation mechanism of isatin monohalogen-derivatives (R = F, Cl, Br and I).

derivative. The peak 3a, due to the oxidation of an oxidation product formed in the second peak 2a, was confirmed by DP voltammetry, Fig. 4A and B.

The phenol oxidation involved the formation of a phenoxy radical that was oxidized in two pathways. In one pathway phenol was oxidized to a *para* and/or *ortho*-quinone derivative that was reversibly reduced. In another pathway phenol initiated polymerization, leading to strongly adsorbed products on the electrode surface [31,33,39,41–45]. It was found that the relative reaction rates of these two pathways depended on the halogen position on the ISA molecule. An oxidation mechanism for isatin 5 (or 7)-monohalogen-derivatives was proposed, Scheme 2.

However, the electroxidised 5-Br-ISA and 5-I-ISA on GCE surface followed the same pathway of ISA, showing only two anodic peaks at higher potentials, and they were more stable compared with the other mono-halogen-ISA derivatives, 5-F-ISA, 5-Cl-ISA, 7-Cl-ISA and 7-I-ISA. So, the oxidation mechanism of 5-Br-ISA and 5-I-ISA is in agreement

with the oxidation mechanism of ISA and with the isatin dihalogen-derivatives described in the section below.

3.1.4.2. Isatin dihalogen-derivatives. The presence of the second halogen atom in the isatin benzene ring hampered the oxidation processes, peaks 1a and 2a, when compared to the isatin monohalogen-derivatives oxidation. The main isatin dihalogen-derivatives oxidation reaction, due to competitive electronic and steric effects, corresponded to the formation of the phenoxy radical polymeric products, but by CV, DP and SW voltammetry, no quinone derivative peaks were detected. The withdrawal of the negative charge from the oxygen atom of the phenoxide anion by two halogen atoms make the isatin dihalogen-derivatives stronger acids compared to isatins monohalogen-derivatives. The effect of the electron withdrawal is stronger for the isatin dihalogen-derivatives isomers with halogen atoms next to the OH group. The shift in the isatin dihalogen-derivatives oxidation peaks 1a and 2a relative to the isatin monohalogen-derivatives was due to the stabilizing effects caused by the second halogen attached on the benzene ring, making it more difficult to remove electrons from the isatin dihalogen-derivatives [45,46].

In all compounds studied the phenoxy radical initiated polymerization which resulted in several oxidation products that were adsorbed on the electrode surface or were oxidized to *para* and/or *ortho*-quinone derivatives, which were reversibly reduced [39]. The relative reaction rates of this two phenoxy radical pathways depended on the number and halogen position on the ISA molecule.

3.2. Reduction

The reduction of ISA and eleven isatin halogen-derivatives was investigated by CV, Figs. 1 and 2, and the reduction of 5-F-ISA was also investigated by DP and SW voltammetry, Figs. 7 and 8.

3.2.1. Cyclic voltammetry

CVs were obtained in the potential range 0.0 V till -1.2 V, in N_2 saturated solutions, in $200 \mu\text{M}$ isatin halogen-derivatives, in physiological 0.1 M phosphate buffer $\text{pH} = 7.0$, Figs. 1 and 2, and Table 2.

The reduction of all halogen-derivatives showed one reversible reduction peak 6c. In the second scan peak 6c current decreased due to strong adsorption of the isatin halogen-derivatives reduction products on the GCE surface. The reduction peak 6c is due to the electron transfer to the quinoid system following the electron transfer to the C-X group with subsequent cleavage of the carbon-halogen bond at positions C5, C7 or C6 [45,47].

CVs obtained in solutions of $200 \mu\text{M}$ of 5-Cl-ISA, 5-F-ISA, 7-I-ISA and 4,6-diBr-ISA also showed a new irreversible cathodic peak 7c, Figs. 1 and 2 and Table 2, due to the reduction of the carbonyl group at the position C3 in the heterocyclic ring [31,33]. In the isatin halogen-derivatives: 5-Br-ISA, 5-I-ISA, 5,7-diCl-ISA, 5,7-diBr-ISA, 5,7-F-Cl-ISA and 5,7-Br-Cl-

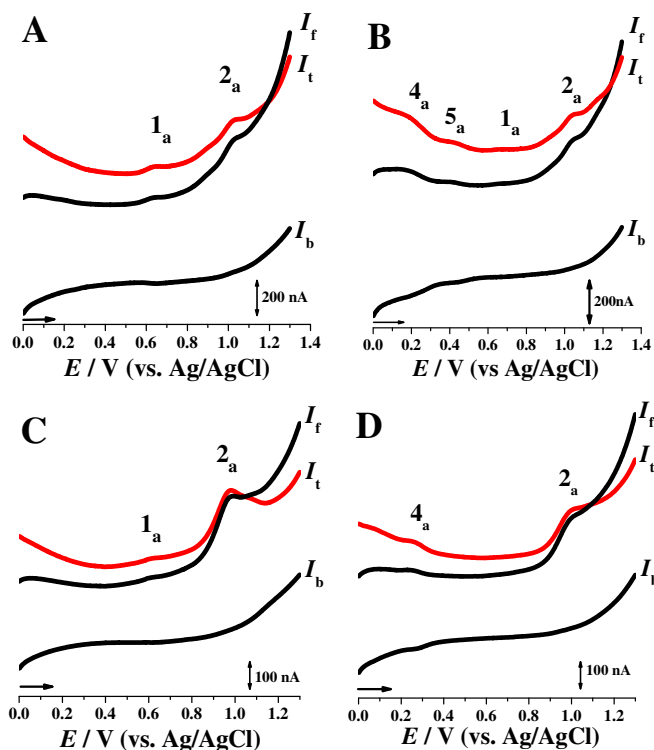


Fig. 6. SW voltammograms in 0.1 M phosphate buffer $\text{pH} = 7.0$ of $20 \mu\text{M}$ 5-F-ISA: (A) first and (B) third scan; and $20 \mu\text{M}$ 7-I-ISA: (C) first and (D) third scan; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, pulse amplitude 50 mV, $v_{\text{eff}} = 50$ mV s^{-1} ; (—) I_t – total current, (—) I_f – forward current, (—) I_b – backward current.

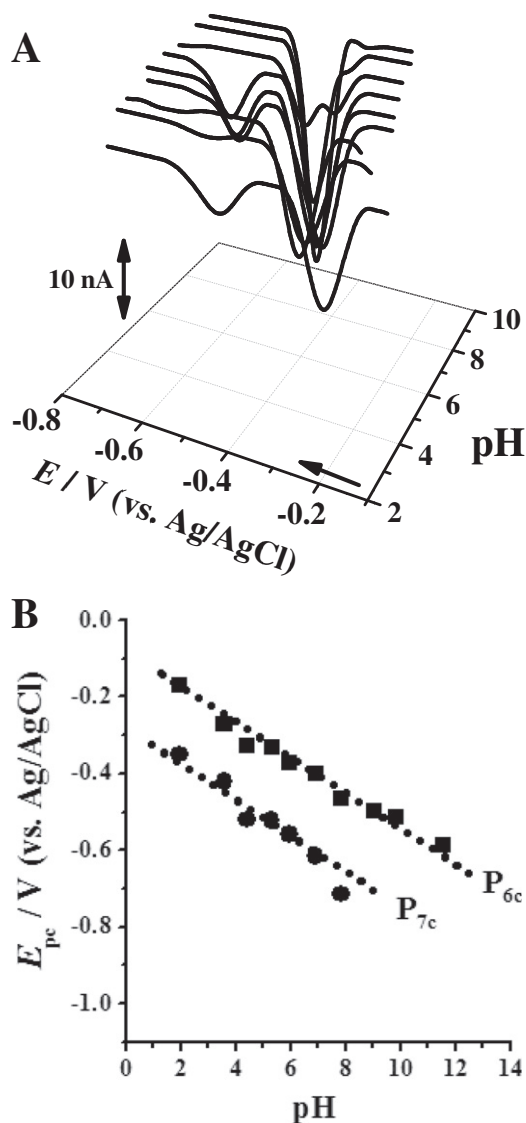


Fig. 7. (A) 3D plot of reduction DP voltammograms in 20 μM 5-F-ISA vs. pH. (B) Plot of (■) E_{p6c} of peak 6c, and (●) E_{p7c} of peak 7c vs. pH. The slope of the line is 59 mV per pH unit.

ISA the cathodic peak 7c was not detected, showing that the presence of the halogen atom in the benzene ring hampered the reduction of the carbonyl in the isatin halogen-derivatives when compared to ISA.

The reduction of 200 μM 5-F-ISA, Fig. 3, showed two successive cathodic peaks, reversible peak 6c, at $E_{p6c} = -0.50$ V, and an irreversible peak 7c, at $E_{p7c} = -0.78$ V. The second CV showed a decrease of peaks 6c and 7c current, due to the 5-F-ISA reduction products adsorption on the GCE surface, Fig. 3.

The isatin halogen-derivatives reduction CVs were compared with the ISA reduction CV [31], where two reduction peaks were detected, at $E_{p6c} = -0.48$ and $E_{p7c} = -0.60$ V, and with the 500 μM ISA reduction CV, Figs. 1A and 2A. However, in the 500 μM ISA CVs, Figs. 1A and 2A, the peak at -0.48 was shifted towards a more cathodic potential at -0.58 V and, as expected, the small peak at -0.60 V was not detected. This is explained because the 500 μM ISA concentration used was much higher than the 300 μM ISA concentration in [31], and the reduction products associated with the first reduction process will be adsorbed on the GCE hindering the electroreduction of the second process. The ISA electroreduction was also investigated using SW voltammetry for a lower ISA concentration and the results, in Section 3.2.3, are in agreement with [31].

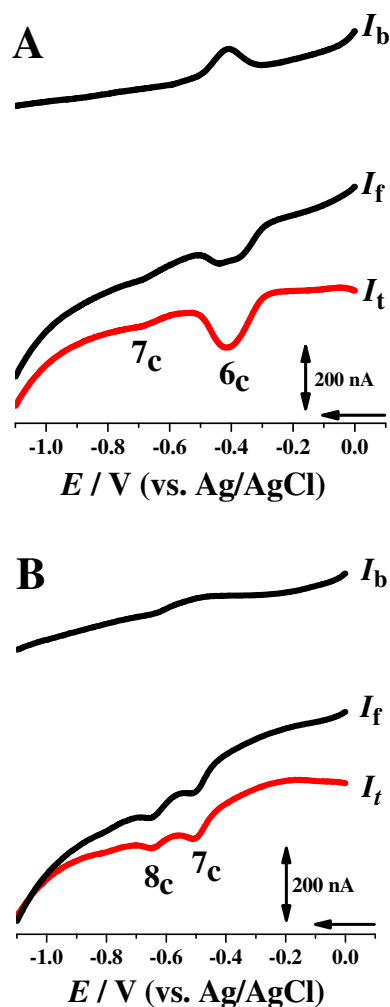


Fig. 8. SW voltammograms in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0 of 20 μM : (A) 5-F-ISA and (B) ISA; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, pulse amplitude 50 mV, $v_{eff} = 50$ mV s $^{-1}$; (—) I_t – total current, (■) I_f – forward current, (■) I_b – backward current.

3.2.2. Differential pulse voltammetry

The electrochemical reduction of 5-F-ISA was studied using DP voltammetry in different 0.1 M ionic strength electrolytes over a range between $2.0 < \text{pH} < 10$.

The DP voltammograms of 20 μM of 5-F-ISA showed two pH-dependent reduction peaks, peak 6c and 7c, and their potential shifted to more negative values with increasing pH. Peak 7c only occurred for electrolytes with $\text{pH} < 8.0$, Figs. 7A and B.

For $2.0 < \text{pH} < 8.0$ the 5-F-ISA pH-dependence was linear for both peaks 6c and 7c, Fig. 7A. In the E_{pc} vs. pH plot, Fig. 7B, the slope of the dotted line was -59 mV per pH unit, and the width at half-height of peak 6c was $W_{1/2} \sim 74$ mV, and of peak 7c was $W_{1/2} \sim 92$ mV, so, both reduction processes occurred with the transfer of one electron and one proton. For $\text{pH} > 8.0$, the one electron transfer reduction peak 6c was pH-independent.

3.2.3. Square wave voltammetry

The 5-F-ISA and ISA electrochemical reduction was studied using SW voltammetry, Fig. 8A and B.

The first SW voltammogram recorded in a solution of 20 μM 5-F-ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, showed two reduction steps, peak 6c, at $E_{p6c} = -0.41$ V, and peak 7c, at $E_{p7c} = -0.70$ V, Fig. 8A, in agreement with the CV and DP voltammetry results. Plotting the forward and

backward components of the total current, the reversibility of peak 6c and the irreversibility of the peak 7c, Fig. 8A, was demonstrated.

However, the first SW voltammogram in a lower concentration solution of 20 μM ISA, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.0, showed two irreversible, peak 7c, at $E_{p7c} = -0.50$ V, associated with the carbonyl group reduction [31], and peak 8c, at $E_{p8c} = -0.64$ V, associated with the reduction of the dimer isatide, formed at the electrode surface after ISA reduction [31], Fig. 8B.

SW voltammetry clearly demonstrated that in the reduction of 5-F-ISA, the first reduction process, peak 6c, was associated with the cleavage of the carbon-halogen bond, and the second reduction process, peak 7c, with the reduction of the carbonyl group at the position C3 in the heterocyclic ring, and that the presence of the halogen atom on the benzene ring hampered the reduction of the carbonyl group in the isatin halogen-derivatives when compared to ISA.

4. Conclusions

The electrochemical behaviour of a group of eleven isatin halogen-derivatives, with a large spectrum in clinical applications, by CV, DP and SW voltammetry, over a wide pH range using a GCE, was investigated. The results showed that the halogen groups attached to the isatin benzene ring strongly influenced the oxidation and reduction mechanisms, and new redox processes, when compared with isatin, occurred. The electrochemical results demonstrated that the monohalogen substitutions, attached to the isatin benzene ring at C5 or C7 position, increased the electron-donor character, while the dihalogen substitutions, attached to the isatin benzene ring at C5, C7 or C4, C6, decreased the electron-donor character, when compared with isatin. The halogens attached on the benzene ring in the isatin structure gave rise to different redox mechanisms depending on the nature, the number, and the position of the halogen substituents on the isatin molecule.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), grant SFRH/BD/87334/2012 (I.P.G. Fernandes), project PTDC/QEQ-MED/0586/2012, project UID/EMS/00285/2013, FEDER funds through the program COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, projects FACEPE-CNPq-BRAZIL (FACEPE-APQ-0535-1.06/14) and (APQ/MCTI/CNPq/Universal/456725/2014-8) (S.C.B. Oliveira), projects CNPq-FAPERJ (CNPq Universal 477108/2013-0; FAPERJ E-26/202.771/2015) (B.V. Silva), and CNPq Fellowship (B.N.M. Silva), are gratefully acknowledged.

References

[1] M. Ischia, A. Palumbo, G. Prota, *Tetrahedron* 44 (1988) 6441.

- [2] M. Yoshikawa, et al., *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998) 886.
 [3] J.F.M. Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 273.
 [4] P. Pakravan, S. Kashanian, M.M. Khodaei, F.J. Harding, *Pharmacol. Rep.* 65 (2013) 313.
 [5] B.V. Silva, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 707.
 [6] S.K. Sridhar, S.N. Pandeya, J.P. Stables, A. Ramesh, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 129.
 [7] M. Pal, et al., *J. Adv. Sci. Res.* 2 (2011) 35.
 [8] H. Pervez, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24 (2009) 848.
 [9] A. González, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5270.
 [10] P. Naumov, F. Anastasova, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 469.
 [11] G. Cerchiari, A.M.C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1473.
 [12] A. Jarrahpour, D. Khalili, E. Clercq, C. Salmi, J.M. Brunel, *Molecules* 12 (2007) 1720.
 [13] C.R. Prakash, S. Raja, *J. Saudi Chem. Soc.* 17 (2013) 337.
 [14] T. Aboul-Fadl, F.A.S. Bin-Jubair, *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 1 (2010) 113.
 [15] K. Kumar, S. Sagar, L. Esau, M. Kaur, V. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012) 153.
 [16] R. Roskoko Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 323.
 [17] R. Sabat, M. Mohammadpour, A. Sadeghi, A. Fassihi, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1113.
 [18] K.L. Vine, J.M. Locke, M. Ranson, S.G. Pyne, J.B. Bremner, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 931.
 [19] K.L. Vine, L. Matesic, J.M. Locke, M. Ranson, D. Skropeta, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 397.
 [20] B.V. Silva, N.M. Ribeiro, M.D. Vargas, M. Lanznaster, J.W.M. Carneiro, R. Krogh, A.D. Andricopulo, L.C. Dias, A.C. Pinto, *Dalton Trans.* 39 (2010) 7338.
 [21] S.N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath, E. DeClercq, *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (1999) 25.
 [22] G. Zapata-Sudo, L.B. Pontes, D. Gabriel, T.C.F. Mendes, N.M. Ribeiro, A.C. Pinto, M.M. Trachez, R.T. Sudo, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86 (2007) 678.
 [23] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications ed., Oxford, 1993.
 [24] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1633.
 [25] S.C.B. Oliveira, M. Vivan, A.M.O. Brett, *Electroanalysis* 20 (2008) 2429.
 [26] H. Shirinzadeh, et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13 (2010) 619.
 [27] S.C.B. Oliveira, C.H.S. Mendes, F.F.S. Filho, N.L. Queiroz, J.A.M. Nascimento, V.B. Nascimento, *J. Electroanal. Chem.* 746 (2015) 51.
 [28] R. Andruzzi, M.E. Cardinali, A. Trazza, *Electrochim. Acta* 17 (1972) 1524.
 [29] A.K. Gupta, R.S. Sindal, *J. Chem. Sci.* 121 (2009) 347.
 [30] G. Farnia, G. Capobianco, A. Romanin, *J. Electroanal. Chem.* 45 (1973) 397.
 [31] V.C. Diculescu, S. Kumbhat, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 190.
 [32] A. Yeagley, et al., *J. Electroanal. Chem.* 651 (2011) 228.
 [33] S.C.B. Oliveira, I.P.G. Fernandes, B.V. Silva, A.C. Pinto, A.M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* 689 (2013) 207.
 [34] B.V. Silva, P.M. Esteves, A.C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 257.
 [35] B.N.M. da Silva, R.S. Bastos, B.V. Silva, A.C. Pinto, *Quim Nova* 33 (2010) 2279.
 [36] T. Sandmeyer, *Helv. Chim. Acta* 2 (1919) 234.
 [37] C.S. Marvel, G.S. Hiers, *Org. Synth. Coll.* 1 (1941) 327.
 [38] R. Beynon, J. Easterby, *The Basics Buffer Solutions*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
 [39] I.P.G. Fernandes, S.C.B. Oliveira, M. Ghalkhani, S. Shahrokhian, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 24 (2012) 618.
 [40] B. Lee, H. Naito, T. Hibino, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 440.
 [41] R.N. Goyal, A. Sandal, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 2135.
 [42] B. Malfoy, J.A. Reynaud, *J. Electroanal. Chem.* 114 (1980) 213.
 [43] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9.
 [44] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis* 23 (2011) 1337.
 [45] H. Lund, O. Hammerich, *Organic Electrochemistry*, 4th ed. Marcel Dekker, New York, 2001.
 [46] Z. Ezerskis, Z. Jusys, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1929.
 [47] J.M. Saveant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*, Wiley-VCH, New Jersey, 2006.



Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation

Isabel P.G. Fernandes, Ana Maria Oliveira-Brett*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2016
Received in revised form 27 September 2016
Accepted 4 October 2016
Available online xxx

Keywords:

Calmodulin
Calcium signalling protein
Denaturing agents
Calcium
Differential pulse voltammetry
Glassy carbon electrode

ABSTRACT

Calmodulin (CaM) is an essential protein present in all eukaryote cells, ranging from vertebrates to unicellular organisms. CaM is the most important Ca^{2+} signalling protein, composed of two domains, N- and C-terminal domains, linked by a flexible central α -helix, and is responsible for the regulation of numerous calcium-mediated signalling pathways. Four calcium ions bind to CaM, changing its conformation and determining how it recognizes and regulates its cellular targets. The oxidation mechanism of native and denatured CaM, at a glassy carbon electrode, was investigated using differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Native and denatured CaM presented only one oxidation peak, related to the tyrosine amino acid residue oxidation. Calcium-induced calmodulin conformational change and the influence of Ca^{2+} concentration on the electrochemical behaviour of CaM were evaluated, and significant differences, in the tyrosine amino acid residue peak potential and current, in the absence and in the presence of calcium ions, were observed. Gravimetric measurements were performed with a graphite coated piezoelectric quartz crystal with adsorbed CaM, and calcium aggregation by CaM was demonstrated.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

Nomenclature

CaM	(calmodulin)
Tyr	(tyrosine)
Trp	(tryptophan)
His	(histidine)
Cys	(cysteine)
Met	(methionine)
SDS	(sodium dodecyl sulphate)
DTT	(dithiothreitol)
TCEP	(tris(2-carboxyethyl)phosphine)
GCE	(glassy carbon electrode)
CV	(cyclic voltammetry)
DP	(differential pulse)
P_{Tyr}	(tyrosine oxidation peak)
EIS	(electrochemical impedance spectroscopy)
EQCM	(electrochemical quartz crystal microbalance)
CPE	(constant phase element)

1. Introduction

Calmodulin (CaM) is a small protein present in all eukaryote cells, ranging from unicellular organisms to vertebrates. CaM is the most important calcium signalling protein, involved in the regulation of numerous Ca^{2+} dependent pathways [1,2].

CaM is essential in all organisms due to the broad spectrum of functions in the control of numerous physiological processes: synthe-

sis and release of neurotransmitters, regulation of intracellular calcium concentration, cell motility and proliferation, apoptosis, autophagy, metabolic homeostasis, protein folding, ions transport, osmotic control, reproductive processes, muscle contraction and gene expression, among others [2,3].

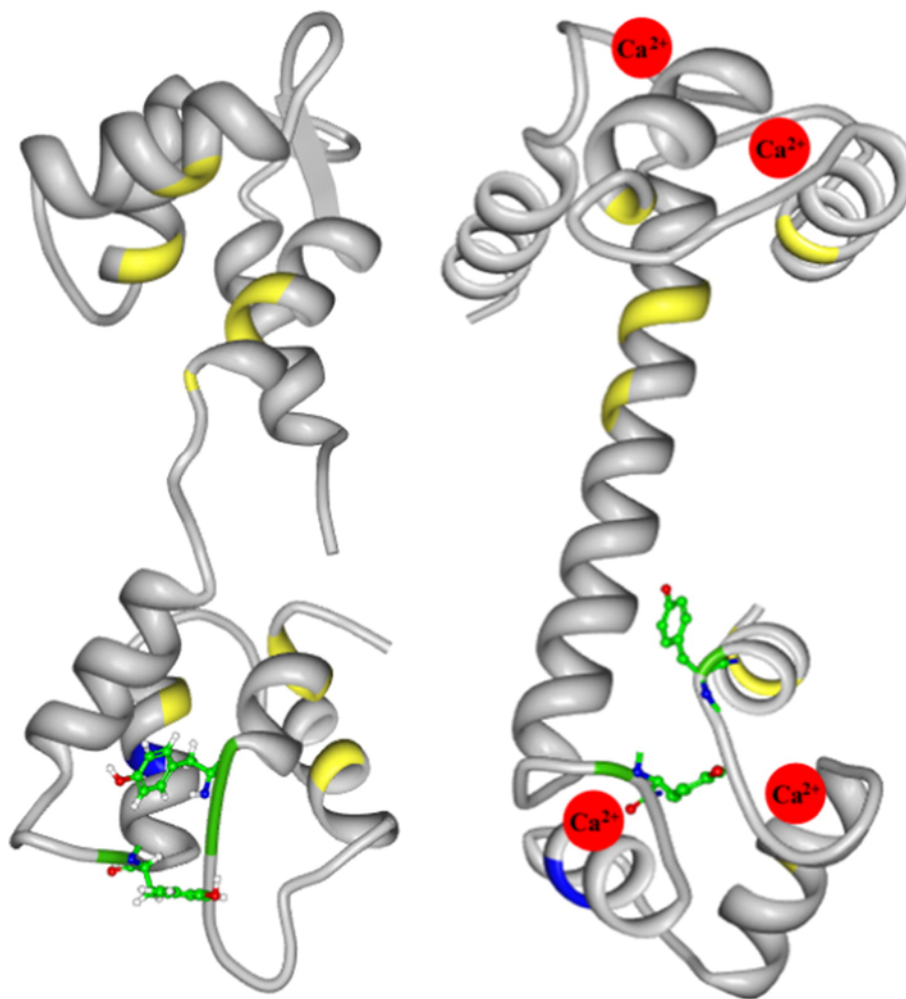
CaM is composed of two domains, N- and C-terminal domains, linked by a flexible central α -helix (Scheme 1) [4]. The N-terminal domain contains EF-hands, EF-1 and EF-2, called CaM_{12} and the C-terminal domain contains EF-hands EF-3 and EF-4, called CaM_{34} [5]. The EF-hand structural motif was devised in 1973 and is the most common calcium-binding motif found in proteins [6].

The EF-hand motif contains a helix-loop-helix topology, much like the thumb and forefinger of the human hand, each representing a helix and the middle finger bent to suggest the octahedral loop in which the Ca^{2+} ions are coordinated by ligands within the loop region (usually about 12 amino acids). The EF-hand motif contains approximately 40 residues and is involved in binding intracellular calcium [6].

The CaM can bind to four calcium ions (two Ca^{2+} per domain) and exists in two forms: without calcium (ApoCaM) and in the calcium saturated form (HoloCaM) [3,5]. Increasing calcium intracellular levels, Ca^{2+} binds to CaM and undergoes an “open form” conformational change with the hydrophobic structure exposed [5].

Each domain of the Ca^{2+} saturated HoloCaM contains a methionine-rich cavity. The flexibility and polarizability of the methionine amino acid residues, present on the hydrophobic surface and other hydrophobic amino acid residues, enable the occurrence of adjustable interaction areas that can aggregate CaM targets [5,6]. CaM is able to bind to a large array of peptides, enzymes, protein myosin kinase, protein kinase II and others, with different sizes and shapes, and modulate their activity in many different ways, leading to biochemical and cellular changes [6,7].

* Corresponding author at: Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal.
Email address: brett@ci.uc.pt (A.M. Oliveira-Brett)



Scheme 1. 3D Structure of Apo-Calmodulin (left) and Holo-Calmodulin (right) with calcium atoms (red) and the electroactive residues, methionine (yellow), tyrosine (green) and histidine (blue) [4]. (For interpretation of the references to color in this scheme legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The Ca^{2+} binding to CaM is not always essential for some of the vital roles and regulatory function of CaM. ApoCaM also binds and can regulate a variety of proteins, including neuromodulin, neurogranin, unconventional myosins and enzymes that can interact with CaM, in the absence or for very low Ca^{2+} concentrations [1].

CaM-dependent signalling mechanisms involved in cell proliferation, programmed cell death or autophagy, are essential in tumour cell biology [2,8,9]. Some studies have demonstrated anomalous intracellular concentrations of CaM and other Ca^{2+} binding proteins in tumour cells, compared with cells from normal tissues [2].

CaM has also been considered a crucial molecule in the etiology of adolescent idiopathic scoliosis and some studies suggest that platelet CaM levels may be a better biomarker for the disease curve progression [11,12].

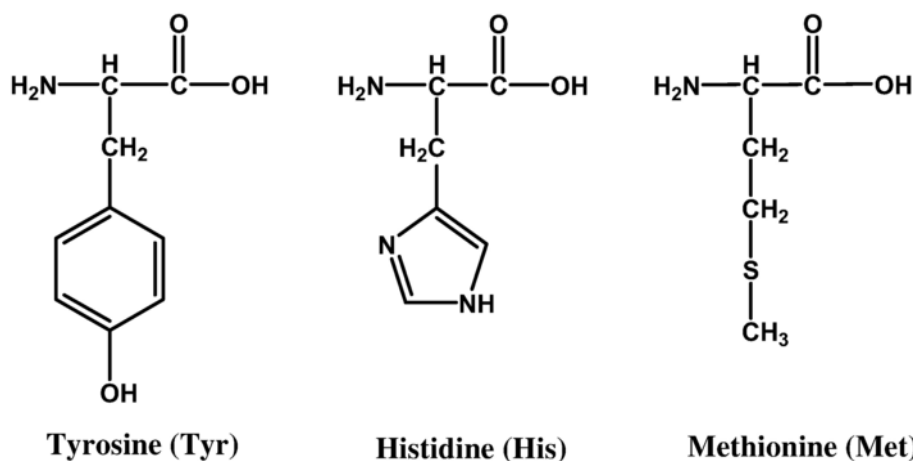
The improvement of effective methods for the determination and quantification of CaM is essential for drug development, clinic diagnosis and disease etiology research due to the importance of CaM in the control of numerous physiological processes. There are some biochemical, thermodynamic and structural studies about CaM and the Ca^{2+} -induced CaM conformational changes [13–17].

Investigation of the electrochemical behaviour and the protein interactions with solid electrode surfaces is very important in drug discovery and a key to novel applications in biosensors, biotechnology and medical devices. The electrochemical study of proteins has been

the main subject of many scientific papers over recent years, using gold and carbon electrodes [18–21]. From the 20 amino acids present in proteins, the oxidation only occurs in five electroactive amino acids: tyrosine (Tyr), at $E_p \sim 0.65$ V, tryptophan (Trp), at $E_p \sim 0.65$ V, histidine (His), at $E_p \sim 1.1$ V, cysteine (Cys), at $E_p \sim 0.55$ V, and methionine (Met), at $E_p \sim 1.25$ V [22]. At carbon electrodes these amino acids are oxidized in an irreversible pH-dependent electron transfer mechanism [23–25].

The CaM structure is formed by a sequence of 148 amino acids, and the electroactive amino acids are methionine (10 residues), tyrosine (2 residues) and histidine (1 residue) (Scheme 2). Tyrosine undergoes oxidation at glassy carbon electrodes and at boron doped diamond electrodes, with one-irreversible peak corresponding to the oxidation of the hydroxyl group [19]. Methionine oxidation occurs in two steps involving the adsorption and the protonation/deprotonation of the thioether group [19,23,24]. Histidine oxidation occurs at a higher positive potential in a single step [22,25].

In the present work, the influence of Ca^{2+} on the CaM conformational change, and the electrochemical oxidation behaviour of native and denature CaM were investigated, using differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy at a glassy carbon electrode, and a quartz crystal microbalance with a graphite coated quartz crystal. In order to unfold CaM tertiary and quaternary structures, the glassy carbon electrode surface modified by a thick



Scheme 2. Chemical structures of the three electroactive amino acids, tyrosine (Tyr), histidine (His), and methionine (Met), in the CaM sequence.

multilayer CaM film was incubated for different time periods with urea, SDS and the reductants TCEP and DTT, and the behaviour of denatured CaM was investigated.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Calmodulin (CaM), from bovine testicles, was obtained from Genaxxon bioscience (Söflinger, Germany) and used without further purification. A stock solution of 60 μM CaM was prepared in deionized water and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$.

Sodium dodecyl sulphate (SDS), dithiothreitol (DTT), tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), urea, calcium chloride hexahydrate (CaCl_2) and potassium hexacyanoferrate (II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Stock solutions of 0.2 M SDS, 0.2 M DTT, 0.1 M TCEP, 8 M urea and 0.2 M CaCl_2 were prepared in deionized water and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Solutions of different concentrations of SDS, DTT, TCEP, and urea were prepared by dilution in 0.1 M (Tris/HCl) pH = 7.0.

All supporting electrolyte solutions were prepared using analytical grade reagents and purified water from a Millipore Mili-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$) (EMD Millipore, Massachusetts, USA) (Certificate ISO 9001 Quality systems standards). The supporting electrolyte buffer solutions were: 0.1 M HAcO/NaAcO acetate buffer pH 3.4, 4.5, and 5.4; 0.1 M Tris/HCl buffer pH = 7.0; 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ phosphate buffer pH 6.08 to 8.05; and 0.1 M $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ buffer pH = 9.25.

Microvolumes were measured using electronic pipettes (EP), EP-10 μM and EP-100 μM , Plus Motorized (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were performed with a CRISON 2001 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) micro pH-meter with an Ingold-combined glass electrode.

All experiments were done at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2. Voltammetric parameters and electrochemical cells

Voltammetric experiments were carried out using a $\mu\text{Autolab}$ Type III potentiostat running with GPES 4.9 software, Metrohm, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a glassy carbon electrode (GCE) ($d = 1.0 \text{ mm}$) as working electrode, a Pt wire counter electrode and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 2 mL one-compartment electrochemical cell (eDAQ, Europe).

The GCE was polished using diamond spray (particle size 1 μm) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and various differential pulse voltammograms were recorded until a steady state baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were scan rate 100 mV s^{-1} , and for differential pulse (DP) voltammetry were pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms and scan rate 5 mV s^{-1} .

The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were carried out using an Autolab PGSTAT 10, and performed using FRA software version 4.9, Metrohm, Utrecht, The Netherlands. A sinusoidal perturbation of root-mean-square (r.m.s.) amplitude 10 mV was applied over the frequency range 10 kHz to 0.1 Hz with seven frequency values per decade. The impedance spectra were analysed by fitting to a Randles-type equivalent electrical circuit using ZView software (Scribner Associates, USA).

The EIS measurements were obtained at the hexacyanoferrate (III)/(II) midpoint potential, $E_{\text{ap}} = +0.20 \text{ V}$, applied to the GCE, in 0.1 M (Tris/HCl) pH = 7.0, and for different concentrations of $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Gravimetric measurements were performed with an electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) integrated in an AWS A20 platform with a graphite coated piezoelectric Au quartz crystal (AuQC_Gr) of 9 MHz central frequency, running with A20RPSoft software (AWSensors, Scientific Technology, Valencia, Spain). The cell integrated in the AWS A20 platform was coupled to computer-controlled SP-200 Research Grade Potentiostat/Galvanostat/FRA running with EC-Lab V10.40 software (Bio-Logic Science Instruments SAS, Claix, France). The Au electrodes were cleaned with Milli-Q water and dried in a stream of pure N_2 . After each measurement, the Au electrodes were cleaned with ethanol, then washed with Milli-Q water, and dried at room temperature.

2.3. Acquisition and presentation of voltammetric data

All the DP voltammograms presented were baseline corrected using the moving average application with a step window of 5 mV, included in GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing artefacts, although the peak current intensity

is in some cases reduced (10%) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original voltammograms was used in the presentation of all experimental voltammograms for a better and clearer identification of the peaks. The values for peak current presented in all graphs were determined from the original untreated voltammograms.

2.4. Electrochemical procedures

The oxidation of the native and denatured CaM was investigated using two experimental procedures.

2.4.1. Procedure 1

For the electrochemical oxidation of native CaM, 100 μL of 60 μM CaM stock solution, 1 mg/mL CaM in water, were placed in the electrochemical cell, containing 100 μL of the supporting electrolyte 0.1 M Tris/HCl buffer pH = 7.0, in order to obtain 30 μM CaM, and DP voltammetry was performed.

2.4.2. Procedure 2

For the electrochemical oxidation of the denatured CaM the GCE surface was modified with an immobilized CaM thick multilayer film, obtained by depositing one drop 5 μL of 60 μM CaM 4 times on the GCE surface and after each drop the GCE was dried under a N_2 constant flux. Then the GCE modified with the CaM film was incubated in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, containing a denaturing agent, 6 M urea, 50 mM TCEP, 50 mM SDS or 10 mM DTT, during different time periods: 30, 60, 120 and 180 min. Afterwards, the CaM modified GCE was removed from the solution, washed with deionized water, to remove the excess of denaturing or reductant agent, and of native and denatured CaM, and placed in the electrochemical cell containing only the supporting electrolyte 0.1 M Tris/HCl buffer pH = 7.0, where DP voltammetry was performed.

3. Results and discussion

The binding of Ca^{2+} to CaM induces a significant conformational change in the protein structure. Consequently, the influence of Ca^{2+} concentration on CaM conformational change will lead to changes in the protein electrochemical behaviour. These changes were evaluated by DP voltammetry and EIS, using the GCE surface modified with a multilayer CaM film, and by the gravimetric measurements (QCM) performed with a graphite coated piezoelectric quartz crystal with adsorbed CaM. However, in order to clearly understand the electrochemical evaluation the Ca^{2+} -induced CaM conformational changes, the electrochemical oxidation, of native and denatured CaM, at the GCE, was also investigated.

3.1. Oxidation of native CaM. Effect of pH

DP voltammetric experiments in 30 μM CaM, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, showed only one oxidation peak, P_{Tyr} at $E_p = +0.66$ V, corresponding to the Tyr⁹⁹ or Tyr¹³⁸ amino acid residue oxidation [26] (Fig. 1).

The electrochemical oxidation of native CaM was also investigated by DP voltammetry, over a wide pH range between 2 and 11. The DP voltammograms were all recorded in solutions of 30 μM CaM, in different buffer electrolytes with 0.1 M ionic strength, and only the Tyr amino acid residue oxidation peak, P_{Tyr} , occurred (Fig. 2). Increasing the pH, the potential shifted to more negative values, and the highest peak current was obtained in 0.1 M phosphate buffer pH ~ 6 (Fig. 2A).

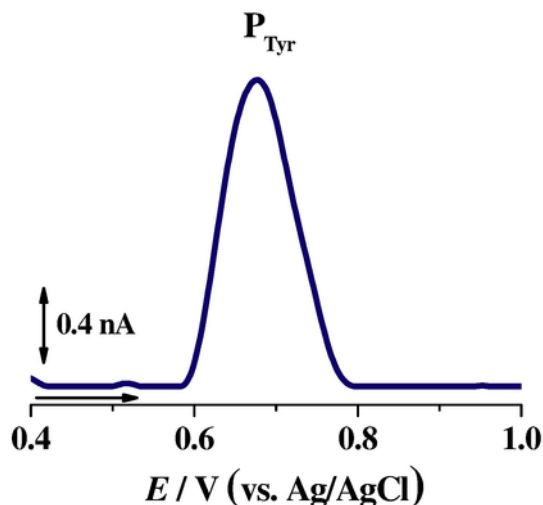


Fig. 1. DP voltammogram baseline corrected of tyrosine, P_{Tyr} , amino acid residue oxidation peak, in 30 μM CaM, 0.1 M (Tris/HCl) buffer solution pH = 7.0. Scan rate 5 mV s^{-1} .

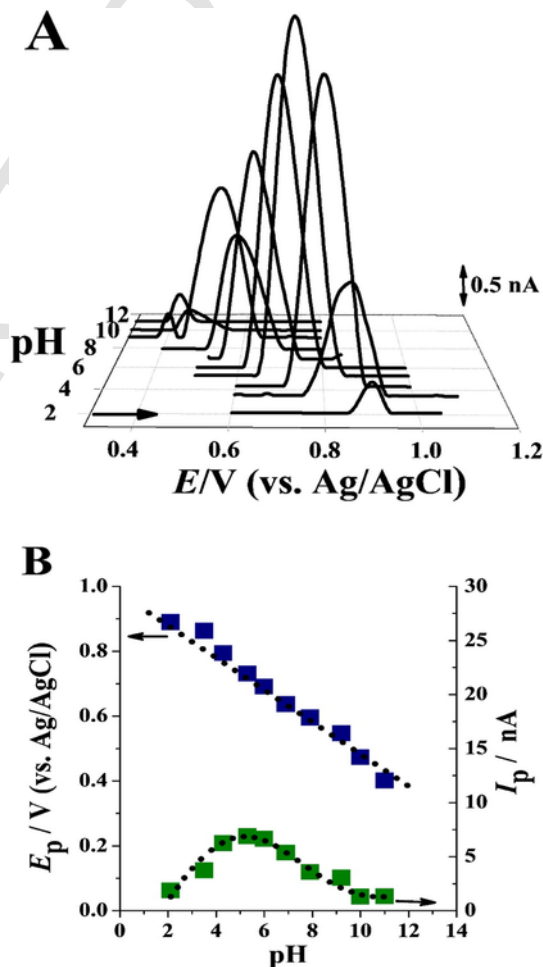


Fig. 2. (A) 3D plot of DP voltammograms baseline corrected of tyrosine, P_{Tyr} , amino acid residue oxidation peak, in 30 μM CaM as a function of pH; (B) Plot of tyrosine, P_{Tyr} , amino acid residue oxidation peak potential (\blacksquare) E_p , and peak current (\blacksquare) I_p vs. pH. Scan rate 5 mV s^{-1} .



The oxidation mechanism involved the same number of electrons and protons because the slope of the dotted line in the E_p vs. pH plot was -59 mV per pH unit (Fig. 2B). Taking into consideration that the peak width at half height was $W_{1/2} \approx 100$ mV, it is concluded that the oxidation process in the native CaM involved the transfer of one electron and one proton, in agreement with the oxidation of Tyr amino acid residues [26].

3.2. CV and EIS characterization of the CaM modified GCE

The GCE surface modified with immobilized multilayer CaM film was characterized using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ as the redox probe, by CV and EIS.

The CV of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ recorded with a bare GCE surface presented one reversible peak, whereas the CV with the GCE modified with immobilized multilayer CaM film showed one irreversible peak (Fig. 3).

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is an effective and convenient method for monitoring the interfacial characterization of electrodes, and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ was used as the redox probe in the EIS measurements at the CaM modified GCE surface [27,28].

A Randles-type electrical equivalent circuit (Scheme 3), was used to fit the experimental spectra. In the circuit, R_Ω represents the cell resistance (solution and bulk composite resistances). The constant phase element (CPE), defined as:

$$\text{CPE} = -(C\omega)^{-\alpha}$$

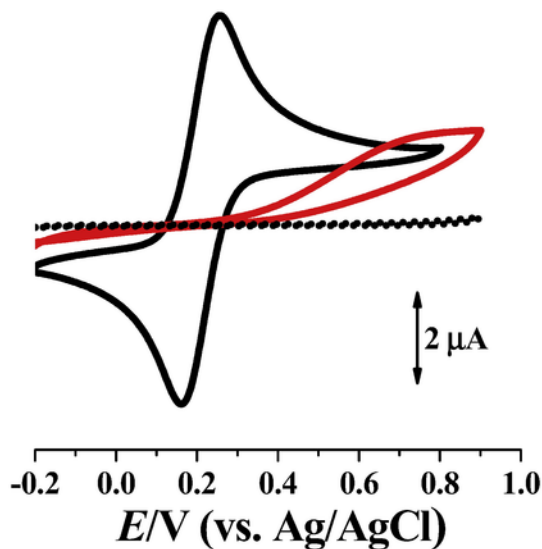
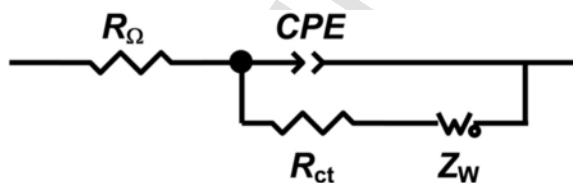


Fig. 3. Cyclic voltammograms, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer solution pH = 7.0: (....) bare GCE, (—) GCE in 3 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and (—) GCE modified with a multilayer CaM film in 3 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Scan rate 100 mV s^{-1} . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Scheme 3. Electrical equivalent circuit for EIS data fitting.

was modelled as a non-ideal capacitor where the capacitance, C , describes the double layer charge separation at the modified electrode-solution interface, ω is the radial frequency in rad s^{-1} , the exponent α is due to the non-uniformity and heterogeneity of the surface. R_{ct} is the charge-transfer resistance across the electrode-solution interface.

The Warburg element, Z_w , represents diffusion and is given by:

$$Z_w(W_o) = R_{\text{diff}}(i\tau\omega)^{-\alpha} ([i\tau\omega]^\alpha) \quad (2)$$

where R_{diff} is a diffusion resistance of electroactive species, τ is a time constant depending on the diffusion rate ($\tau = l^2/D$, where l is the effective diffusion thickness, and D is the effective diffusion coefficient of the species), the exponent $\alpha = 0.50$ for a perfect uniformly flat interface. Values of $\alpha < 0.50$ correspond to a non-uniform interface.

The complex plane impedance plots were recorded at the hexacyanoferrate (III)/(II) midpoint potential, $E_{\text{ap}} = +0.20$ V, applied to the GCE, in 1, 3 and 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0 (Fig. 4).

The GCE modified with the immobilized multilayer CaM film showed a semi-circle corresponding to the occurrence of the charge transfer reaction, with a charge transfer resistance (R_{ct}), represented by the diameter of the semi-circle, larger than that at a bare GCE (Fig. 4). It was observed, as expected, for the GCE with and without immobilized multilayer CaM film, that the R_{ct} values decreased with increasing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ concentration.

The $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redox process using the GCE surface modified with immobilized multilayer CaM film gave a $R_{ct} \sim 500$ k Ω (Fig. 4B) (curve \blacksquare) for 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, while the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redox process using the bare GCE, for 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, showed a much lower $R_{ct} \sim 50$ k Ω (Fig. 4A) (curve \square).

The increase of R_{ct} using the GCE modified with the multilayer CaM film was expected, since the immobilized CaM molecules on GCE surface blocked electron transfer between the redox probe and the GCE surface, leaving approximately 10% of the glassy carbon electrode surface uncovered.

3.3. Effect of denaturing agents on CaM oxidation

Proteins are complex molecules that follow structural organization levels. The denaturing process causes morphological changes in the 3D structure which unfolds, covering the electrode surface and making the electrochemical oxidation of the electroactive amino acid residues easier.

The denaturing agent urea, the most widely used, affects the secondary and tertiary structure without affecting the primary structure, because of its high affinity for peptide bonds, breaking the hydrogen bonds and the salt bridges between positive and negative side chains, thereby disrupting the tertiary structure of the peptide chain.

The use of the denaturing detergent SDS, that dissolves hydrophobic proteins, and the reducing agents DTT or TCEP, that disrupt disulfide bonds, was also important for a qualitative and quantitative analysis in proteomic oxidation mechanisms investigation.

Both denaturing agents DTT and TCEP are electroactive on GCE, in phosphate buffer pH = 7.0, with one oxidation peak for DTT, at $E_p \approx +1.15$ V, and for TCEP, at $E_p \approx +0.9$ V [29]. SDS and urea are not electroactive.

The oxidation process at the GCE modified with immobilized multilayer CaM film showed one small oxidation peak (Fig. 5) (\blacksquare), corresponding to the Tyr⁹⁹ or Tyr¹³⁸ amino acid residue oxidation, at

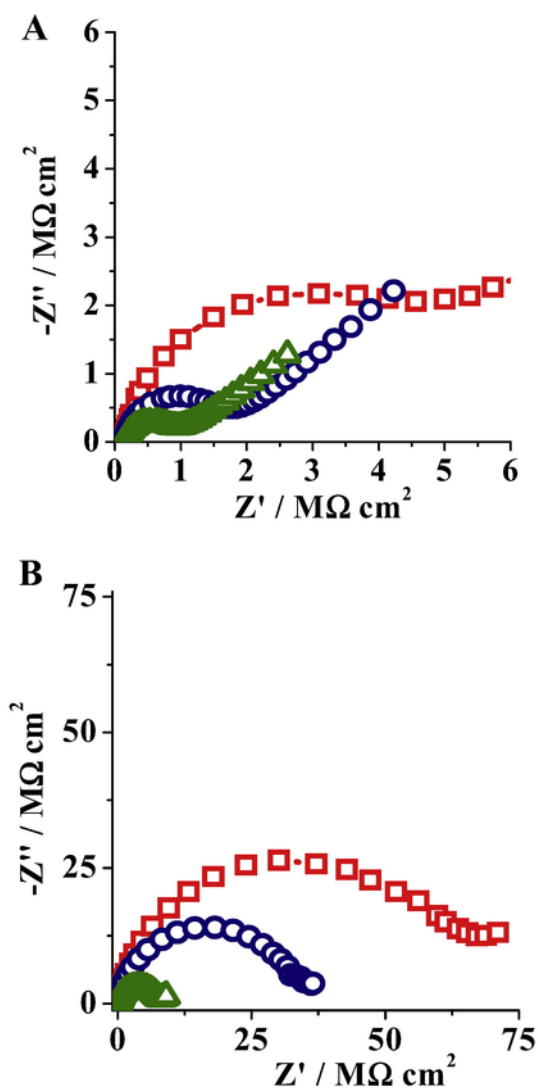


Fig. 4. Complex plane impedance spectra, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, for (□) 1, (○) 3 and (△) 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, at ferrocyanide applied midpoint potential, $E_{ap} = +0.2$ V: (A) bare GCE and (B) GCE modified with a multilayer CaM film.

$E_p = +0.66$ V, in agreement with the CaM oxidation DP voltammogram (Fig. 1).

The effect of the denaturing agents on CaM electrochemical oxidation was evaluated by comparing the behaviour of the GCE modified with immobilized multilayer native CaM film as control, with the changes observed after interaction with each denaturing agent. A new film was always prepared for each experiment. After incubation the GCE was washed with deionized water to remove the excess of denaturant and only then the DP voltammograms, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, were recorded.

The multilayer native CaM film immobilized on GCE, Procedure 2, was denatured after incubation in the agents 50 mM SDS and TCEP, 10 mM DTT, and 6 M urea, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, during different time periods: 30, 60, 120 and 180 min (Fig. 5). The oxidation mechanism of denatured CaM film immobilized on GCE was investigated using DP voltammetry. Care was taken for the GCE surface to be completely covered by the CaM molecules immobilized multilayer film, in order to avoid non-specific adsorption and binding of denaturant molecules.

After incubation of the GCE modified with immobilized multilayer CaM film in 6 M urea solution, for different time periods, an increase of the Tyr amino acid residue oxidation peak, P_{Tyr} , current, at $E_p = +0.66$ V, occurred but no new CaM oxidation peaks were observed (Fig. 5A).

DP voltammograms of GCE modified with immobilized multilayer CaM film after incubation in SDS showed a marked decrease of the Tyr amino acid residue oxidation peak, P_{Tyr} , current after 30 min, but no new oxidation peaks were detected when compared with the control (Fig. 5B). The peak current increased again after 180 min. This was due to the SDS affecting the protein structure. SDS is a denaturing agent that disrupts noncovalent interactions by electrostatic repulsion, transforming the protein into a linear polypeptidic chain.

DP voltammograms of GCE modified with immobilized multilayer CaM film after incubation in reductants DTT or TCEP presented no significant changes, besides the Tyr oxidation peak current, P_{Tyr} , decrease after 30 min but no new peaks occurred (Fig. 5C and D). DTT and TCEP have been applied to protein samples to cleave the disulphide bond of cysteine amino acid residues [18]. The results are coherent because CaM has no cysteine group, so DTT did not cause any effect on CaM structure.

However, the DP voltammograms of GCE modified with immobilized multilayer CaM film after 60 min incubation in TCEP showed the Tyr amino acid residue oxidation, P_{Tyr} , peak, and a new peak, at $E_p = +0.95$ V, corresponding to the His amino acid residue oxidation, P_{His} , also occurred. The influence of TCEP on CaM three-dimensional structure was more extensive than that of DTT.

Denaturation of CaM by urea, SDS, DTT and TCEP was performed using a GCE modified with immobilized multilayer CaM film for different incubation time periods. Urea caused an enhancement of the Tyr amino acid residue oxidation peak, P_{Tyr} , current, due to a better access to the GCE surface. SDS and DTT caused a decrease of the Tyr amino acid residue oxidation peak current, due to their high reactivity to promote a total unfolding of the CaM structure, which made the interaction and subsequent adsorption of non-electroactive amino acid residues to the electrode surface easier, but no new peak appeared. TCEP after 60 min showed an enhancement of the Tyr amino acid residue oxidation peak, P_{Tyr} , current and the new His amino acid residue oxidation peak, P_{His} , occurred.

3.4. Electrochemical evaluation of the Ca^{2+} -induced CaM conformational changes

CaM is involved in the regulation of numerous Ca^{2+} -dependent pathways and undergoes a Ca^{2+} -induced change in conformation, leading to biochemical and cellular changes, being one of the most important signalling proteins. Structurally, the CaM calcium saturated form (HoloCaM) contains four Ca^{2+} binding sites (Scheme 1).

The Ca^{2+} ligand-binding site of CaM contains aspartic and glutamic acid; two negatively charged amino acids at physiological pH. Once Ca^{2+} is bound to CaM there are many conformational changes in the protein secondary structure. The electroactive Tyr residues are situated in close proximity to the Ca^{2+} binding sites, and the Ca^{2+} -CaM changes on secondary structure can affect the Tyr residues redox signal, i.e. oxidation peak potential and current. Therefore, the redox behaviour of CaM in the presence of different Ca^{2+} concentrations, by DP voltammetry, at the GCE, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, was investigated.

The DP voltammogram in 30 μ M CaM without Ca^{2+} showed an anodic peak P_{Tyr} , at $E_p = +0.66$ V, corresponding to the Tyr⁹⁹ or Tyr¹³⁸ amino acid residue oxidation. Taking into consideration the CaM secondary structure (Scheme 1), it is likely that the Tyr⁹⁹ was

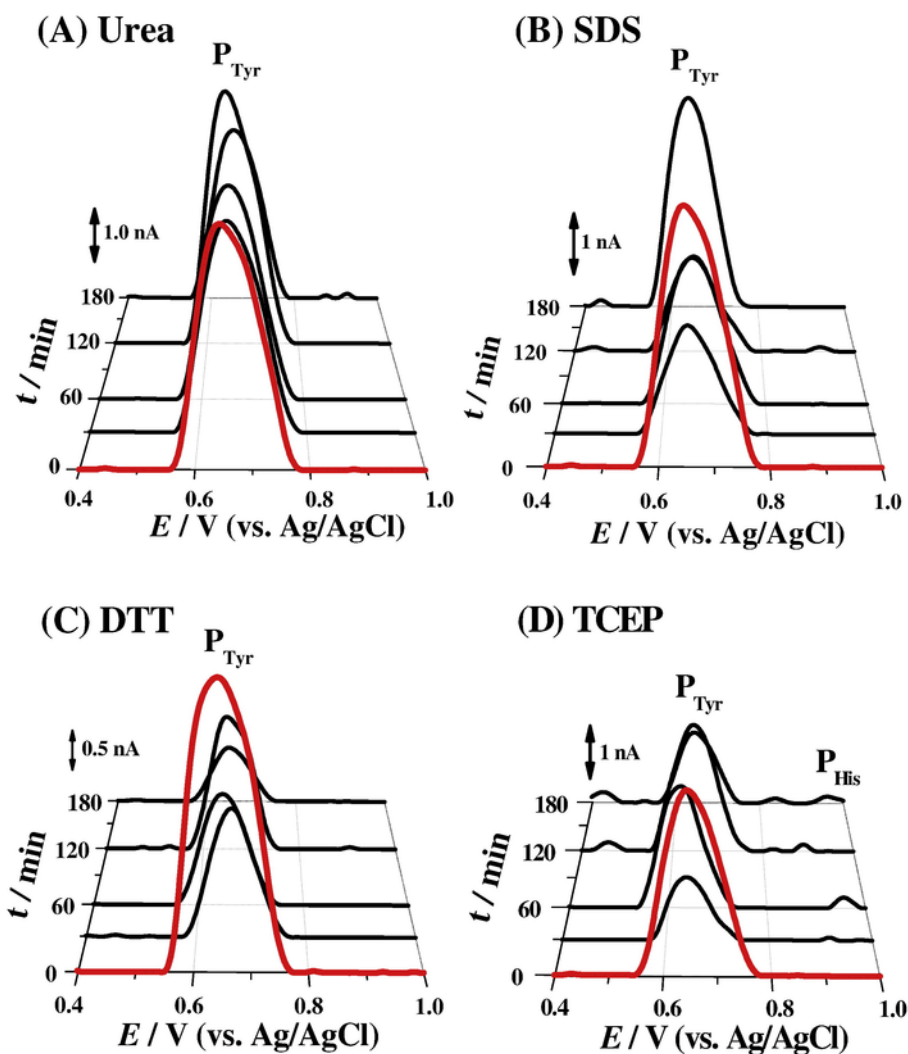


Fig. 5. DP voltammograms baseline corrected, at GCE modified with a multilayer CaM film, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0: (—) before and (—) after incubation in: (A) 6 M urea, (B) 50 mM SDS, (C) 10 mM DTT, and (D) 50 mM TCEP. Scan rate 5 mV s⁻¹. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

more easily oxidized than Tyr¹³⁸, since the last one is surrounded by three α -helix regions.

In the DP voltammograms in 30 μ M CaM containing micromolar Ca²⁺ concentrations (30, 60 and 120 μ M) (Fig. 6A), the Tyr amino acid residue oxidation potential was slightly shifted to a more positive potential and the oxidation peak current decreased and was inversely proportional with the increase of Ca²⁺ concentration. At 120 μ M Ca²⁺ the Tyr amino acid residue oxidation peak current had the lowest value, corresponding to the 1 CaM:4 Ca²⁺ ratio (Scheme 1).

In the DP voltammogram in 30 μ M CaM containing 1 mM Ca²⁺, the Tyr amino acid oxidation occurred at the same potential, and with the same current, as for 120 μ M Ca²⁺ (Fig. 6A). Increasing the Ca²⁺ concentration up to 10 mM Ca²⁺ the oxidation peak current remained the same but the Tyr amino acid residue oxidation peak potential was shifted to more positive potentials, at $E_p \approx +0.8$ V.

However, in 30 μ M CaM containing higher Ca²⁺ concentrations, > 30 mM, the Tyr amino acid residue oxidation peak current, in the DP voltammogram, increased one fold and the peak potential re-

mained constant, at $E_p \approx +0.8$ V (Fig. 6B). The current decrease and the positive potential shift are due to the Ca²⁺-induced CaM conformational changes.

For high Ca²⁺ concentrations, the Tyr¹³⁸ phenol moiety remained between the α -helix regions being protected for oxidation, but the Tyr⁹⁹ phenol moiety became more close to the protein backbone (Scheme 1) (right), and the nearby presence of other non-electroactive amino acid residues made the Tyr amino acid residue oxidation more difficult.

3.5. EIS characterization of Ca²⁺-induced CaM conformational changes

The influence of Ca²⁺ concentration on the surface of GCE modified with immobilized multilayer CaM film was also probed by EIS, at the hexacyanoferrate (III)/(II) midpoint potential, $E_{ap} = +0.20$ V, applied to the GCE, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0. EIS were recorded for 1, 3 and 5 mM K₄[Fe(CN)₆] solutions. Complex plane plots, in 3 mM K₄[Fe(CN)₆], for different Ca²⁺ concentrations, between 60 μ M and 1 mM, are presented in Fig. 7.

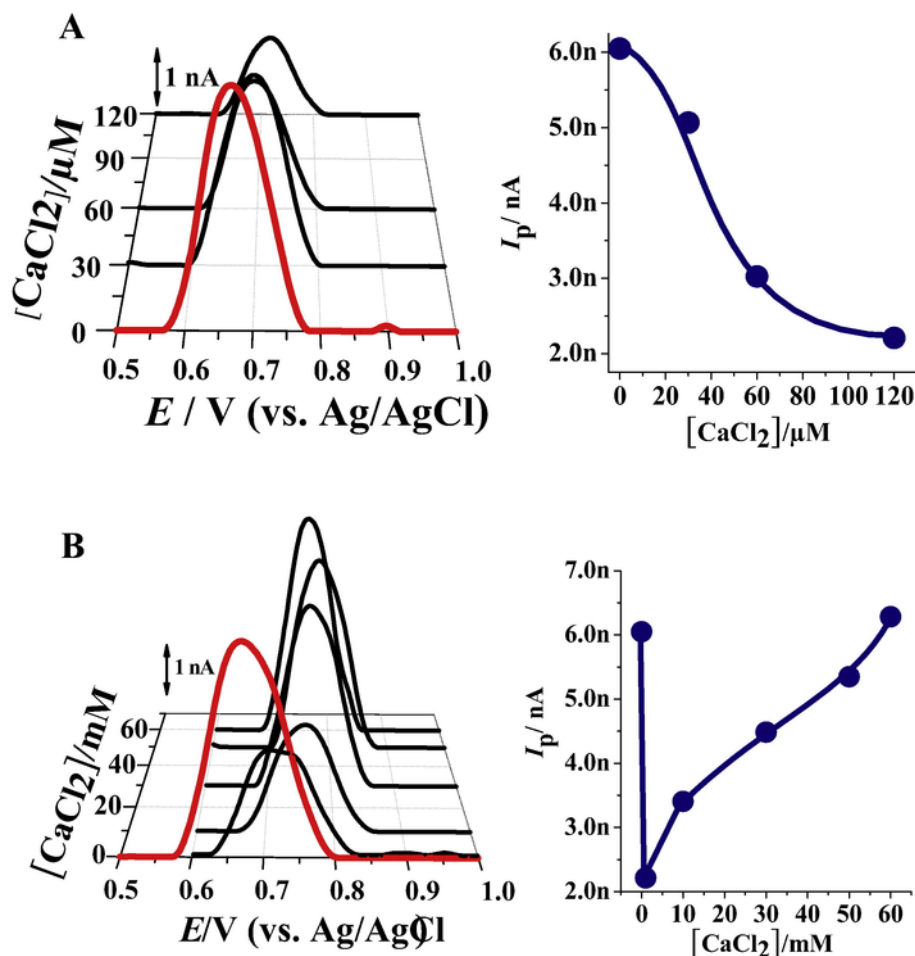


Fig. 6. DP voltammograms baseline corrected in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, (—) 30 μM of CaM and (—) 30 μM CaM with different concentrations of $CaCl_2$: (A) 0, 30, 60 and 120 μM , and (B) between 0 and 60 mM. Scan rate 5 $mV s^{-1}$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

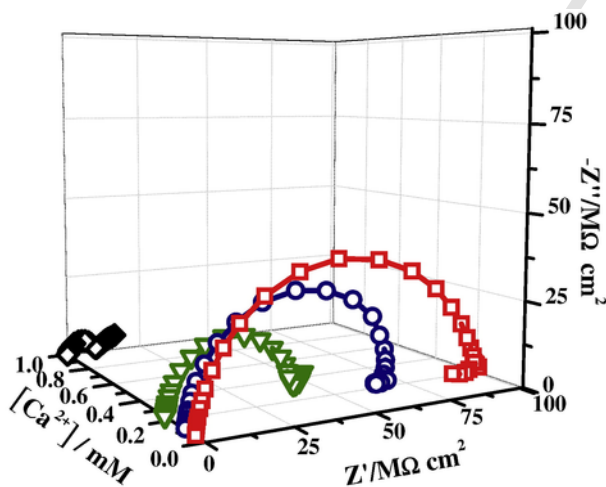


Fig. 7. Complex plane impedance spectra 3D plot of the GCE modified with a multilayer CaM film, in 3 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, at ferrocyanide applied midpoint potential, $E_{sp} = +0.20 V$, for (□) 60 μM , (○) 120 μM , (▽) 240 μM , and (◇) 1 mM $CaCl_2$ concentrations.

The EIS were fitted using the Randles-type equivalent electrical circuit (Scheme 3), as previously, see Section 3.2.

The spectra showed that, increasing the Ca^{2+} concentrations, both real and imaginary impedance decreased (Fig. 7). For a higher Ca^{2+} concentration, 1 mM, it was possible to observe two regions: the semi-circular part at higher frequencies corresponding to the electron transfer process and a linear part at lower frequencies corresponding to diffusion (Fig. 7). At Ca^{2+} concentrations below 240 μM only the electron transfer process region was observed.

Analysis of the spectra, Table 1, showed a decrease in R_{ct} with increase of Ca^{2+} concentration in the solution leading to an increase of the available electrode surface area. The diffusion resistance increased with the Ca^{2+} concentration due to the change in the CaM conformation at the electrode surface.

The values of $\alpha_1 \sim 0.94$, close to 1.0, are related with the electrode/CaM interface, and remained constant upon increasing the Ca^{2+} concentration, indicating that there is a homogeneous non-porous interface, not influenced by Ca^{2+} concentration. For a higher concentration of Ca^{2+} , the diffusional Warburg resistance was identified with a high diffusional time of 200 s, indicating a slow diffusion of Ca^{2+} within the protein layer for the high Ca^{2+} concentration. The value of $\alpha_2 = 0.42$ corresponds to Ca^{2+} ions diffusion through a CaM protein uniform layer on the electrode surface.

Low frequency inductive loops appeared for lower Ca^{2+} concentration because the CaM conformational change did not occur, the

Table 1

EIS data fitting equivalent circuit (Scheme 3, Fig. 7), for a GCE surface modified with a multilayer CaM film, in 0.1 M (Tris/HCl) buffer pH = 7.0, for different Ca^{2+} concentrations, in 3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, at the hexacyanoferrate(III)/(II) applied midpoint potential, $E_{\text{ap}} = +0.20$ V.

Ca^{2+} μM	R_{Ω} Ω	R_{ct} $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$	CPE_{dl} $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$	α_1	Z_W $\text{k}\Omega \text{ cm}^2 \text{ s}^{\alpha-1}$	τ s	α_2
60	1.91	5.5	16.6	0.94	–	–	–
120	1.95	4.3	15.4	0.94	–	–	–
240	2.08	2.4	19.1	0.95	–	–	–
1000	2.12	0.5	15.4	0.94	1.7	200	0.42

Abbreviations: R_{Ω} - cell resistance, R_{ct} - charge-transfer resistance, CPE_{dl} - double layer constant phase element, α - surface non-uniformity and heterogeneity, Z_W - Warburg element, τ - time constant depending on diffusion rate.

CaM structure was rigid and the protein was attached to the electrode surface in a conformation less favourable for charge transfer to take place.

In the presence of higher Ca^{2+} concentrations, the protein underwent a Ca^{2+} -induced conformational change to an “open form”, becoming more flexible at the electrode surface, enabling the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ions to reach the GCE surface more easily, leading to a lower value of charge transfer resistance. At the same time, the flexibility of the protein hinders the diffusion process. Moreover, the diffusion resistance increase can be associated with a competition between $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ and Ca^{2+} ions, to reach the electrode surface.

3.6. Gravimetric study of Ca^{2+} -induced CaM conformational changes

The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) is an essential tool that enables the monitoring of both mass changes and current during the potential cycling. The mass variation in time can be monitored on the basis of the relationship between the induced frequency variation and the deposited mass on the QCM crystal.

In the specific case of rigid films adsorbed at the QCM crystal surface, the relationship is described by the Sauerbrey equation:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}}\Delta m \quad (3)$$

where f_0 is the resonant frequency (for these crystals is 9 MHz), Δf is the frequency change (Hz), Δm is the mass change (g), A is the piezoelectrically active crystal area, ρ_q is the density of quartz (2.648 g cm^{-3}), and μ_q is the shear modulus of quartz for AT-cut crystals ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$) which leads to $\Delta f/\Delta m = -894 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1}$.

The aggregation of Ca^{2+} ions by CaM was observed using a quartz crystal microbalance (QCM). The gravimetric measurements were performed in an graphite coated piezoelectric quartz crystal (AuQC_Gr) with the surface covered with a drop of 10 μL of 60 μM CaM, dried at room temperature. Once dried, the crystal was placed in the QCM and covered with 5 mL of buffer solution, 0.1 M (Tris/HCl) pH = 7.0. Afterwards, successive additions of CaCl_2 were performed, the frequency variation was recorded, and the mass changes in the modified electrode were determined. The frequency obtained after stabilization of the system was taken as the reference value, to make easier to follow the change in frequency, corresponding to each Ca^{2+} ion addition.

After each addition of 30 μL of 10 mM CaCl_2 the corresponding frequency was determined (Fig. 8). The frequency peaks that appear

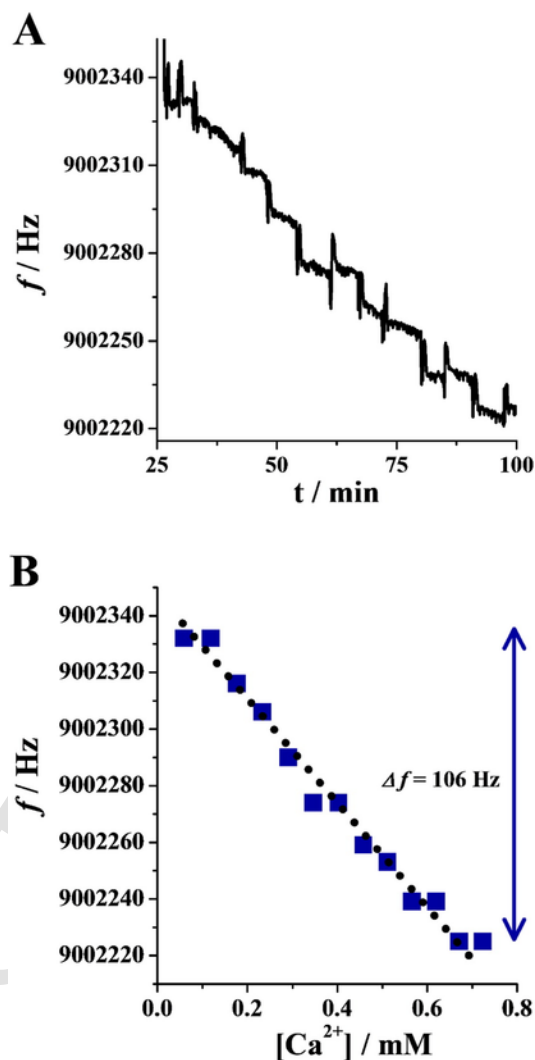


Fig. 8. Frequency variation, of the graphite coated piezoelectric quartz crystal with adsorbed CaM, function of: (A) time, after successive additions of 30 μL of 10 mM CaCl_2 , and (B) calcium ion concentration in solution.

are due to the noise caused by each addition. It was observed that the aggregation of Ca^{2+} by CaM does not occur uniformly (Fig. 8A). In the first and second steps, the Ca^{2+} concentration in the solution was $\sim 120 \mu\text{M}$ and the frequency did not change, remaining constant, which means that the mass change did not occur (Fig. 8B).

After the addition of 90 μL Ca^{2+} , corresponding to 180 μM Ca^{2+} , the mass in the electrode surface increased with increasing Ca^{2+} concentration. The frequency started decreasing successively until the Ca^{2+} concentration in the solution was $\sim 350 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . These results were expected because, in the presence of Ca^{2+} , the protein changes its conformation from Apo-CaM to Holo-CaM.

CaM can bind four Ca^{2+} ions, consequently the mass detected in the electrode surface increased. For Ca^{2+} concentrations higher than 350 μM the frequency continued to decrease but not linearly. In the presence of higher Ca^{2+} concentrations, the protein became more flexible on the electrode surface and this flexibility may make the aggregation of Ca^{2+} to the protein molecules adsorbed in the innermost film layer at the electrode surface more difficult.

The total frequency variation detected for the successive additions of Ca^{2+} was 106 Hz, which corresponded to a mass increase at the electrode surface of 0.12 μg of Ca^{2+} . Ideally the mass increase should

have been $\sim 0.1 \mu\text{g}$ (value calculated from the ratio $1:4 \text{ CaM}/\text{Ca}^{2+}$) but the value obtained from the frequency was slightly higher which meant that at the same time some Ca^{2+} adsorption at the electrode surface also occurred.

4. Conclusions

Calmodulin (CaM) is an essential protein present in all organisms and is one of the most important Ca^{2+} signalling proteins, responsible for the regulation of numerous Ca^{2+} -mediated signalling pathways.

The oxidation of native and denatured CaM was characterized by DP voltammetry. The native CaM oxidation showed a pH-dependent peak corresponding to the Tyr amino acid residue oxidation. The denaturing agent urea unfolded the CaM molecule, improved the electrochemical response and sensitivity, and enhanced the Tyr oxidation peak current. SDS and DTT unfolded the CaM molecule but caused a marked decrease of the Tyr oxidation peak current, due to their high reactivity, which caused CaM molecule conformational changes, enabling the interaction and the adsorption of CaM non-electroactive amino acid residues on the electrode surface easier. TCEP had a similar behaviour but an enhanced Tyr oxidation peak current and a new peak corresponding to His amino acid residue oxidation was observed.

The interaction of Ca^{2+} with CaM was evaluated by DP voltammetry and EIS, and significant changes of Tyr amino acid residue oxidation peak potential and current, decreasing for lower concentration and increasing for higher Ca^{2+} concentrations, were found. The Ca^{2+} bind with adsorbed CaM, on a graphite coated piezoelectric quartz crystal, was demonstrated, and the relationship between the induced frequency variation and the deposited mass in time, was monitored.

These results showed that the Ca^{2+} -induced CaM conformational structural changes resulted in an alteration of Tyr amino acid residues electrochemical signal and may constitute the base for the development of a new generation of CaM based Ca^{2+} biosensors.

Uncited reference

[10]

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), grant SFRH/BD/87334/2012 (I.P.G. Fernandes), project UID/EMS/00285/2013, and FEDER funds through the program COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, is gratefully acknowledged.

References

- [1] L.A. Jurado, P.S. Chockalingam, H.W. Jarrett, Apocalmodulin, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 661–677.
- [2] M.W. Berchtold, A. Villalobo, The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 398–435.
- [3] G. Gibrat, L. Assairi, C.T. Craescu, G.H.B. Hoa, D. Loew, B. Lombard, L. Blouquit, M.-C. Bellissent-Funel, Use of SANS and biophysical techniques to reveal subtle conformational differences between native apo-calmodulin and its unfolded states, *Biochim. Biophys. Acta* 1824 (2012) 1097–1106.
- [4] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (PDB ID: 1CFD and 1CLL).
- [5] D. Chin, A.R. Means, Calmodulin: a prototypical calcium sensor, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 322–328.
- [6] A. Lewit-Bentley, S. Réty, EF-hand calcium-binding proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000) 637–643.
- [7] H. Tidow, P. Nissen, Structural diversity of calmodulin binding to its target sites, *FEBS J.* 280 (2013) 5551–5565.
- [8] C.R. Kahl, A.R. Means, Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 719–736.
- [9] J.S. Shim, J. Lee, K.N. Kim, H.J. Kwon, Development of a new Ca^{2+} /calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 747–751.
- [10] D. Gallo, Y. Jacquot, G. Laurent, G. Leclercq, Calmodulin, a regulatory partner of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 291 (2008) 20–26.
- [11] F. Miyajiri, Adolescent idiopathic scoliosis: current perspectives, *Orthop. Res. Rev.* 6 (2014) 17–26.
- [12] R. Dayer, T. Haumont, W. Belaeff, P. Lascombes, Idiopathic scoliosis: etiological concepts and hypotheses, *J. Child. Orthop.* 7 (2013) 11–16.
- [13] K. Ding, Z. Jia, Q. Wang, X. He, N. Tian, R. Tong, X. Wang, Electrochemical behavior of the self-assembled membrane formed by calmodulin (CaM) on an Au substrate, *J. Electroanal. Chem.* 513 (2001) 67–71.
- [14] P. Geng, Y. Fu, M. Yang, Q. Sun, K. Liu, X. Zhang, Z. Xu, W. Zhang, Amplified electrochemical immunosensor for calmodulin detection based on gold-silver-graphene hybrid nanomaterials and enhanced gold nanorods labels, *Electroanalysis* 26 (2014) 2002–2009.
- [15] J. Stigler, M. Rief, Calcium-dependent folding of single calmodulin molecules, *Biophys. Comp. Biol.* 109 (2012) 17814–17819.
- [16] Y. Komeijia, Y. Uenob, M. Uebayasia, Molecular dynamics simulations revealed Ca^{2+} -dependent conformational change of calmodulin, *FEBS Lett.* 521 (2002) 133–139.
- [17] C.M. Shepherd, H.J. Vogel, A molecular dynamics study of Ca^{2+} -calmodulin: evidence of interdomain coupling and structural collapse on the nanosecond timescale, *Biophys. J.* 87 (2004) 780–791.
- [18] S.C.B. Oliveira, I.B. Santarino, A.M. Oliveira-Brett, Direct electrochemistry of native and denatured anticancer antibody rituximab at a glassy carbon electrode, *Electroanalysis* 25 (2013) 1029–1034.
- [19] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry* 89 (2013) 11–18.
- [20] E. Paleček, V. Ostatná, Electroactivity of nonconjugated proteins and peptides. Towards electroanalysis of all proteins, *Electroanalysis* 19 (2007) 2383–2403.
- [21] J.J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, D.B. Hibbert, Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9006–9007.
- [22] A.L. Burrows, L.-H. Guo, H.A.O. Hill, G. McLendon, F. Sherman, Direct electrochemistry of proteins, *Eur. J. Biochem.* 202 (1991) 543–549.
- [23] T.A. Enache, A.M. Oliveira Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry* 81 (2011) 46–52.
- [24] J.A. Reynaud, B. Malfoy, P. Canesson, Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: part I. Sulfur components: cystine, cysteine, methionine, *J. Electroanal. Chem.* 114 (1980) 195–211.
- [25] V. Brabec, V. Mornstein, Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes: II. Electrooxidation of amino acids, *Biophys. Chem.* 12 (1980) 159–165.
- [26] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 9–16.
- [27] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 4599–4605.
- [28] A.M. Oliveira-Brett, C.M.A. Brett, L.A. Silva, An impedance study of the adsorption of nucleic acid bases at glassy carbon electrodes, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 33–35.
- [29] I.B. Santarino, S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation, *Electrochem. Commun.* 23 (2012) 114–117.

Accepted Manuscript

Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1-methyl, and their halogenated derivatives, redox behaviour

Isabel P.G. Fernandes, Bárbara V. Silva, Bianca N.M. Silva, Angelo C. Pinto, Severino Carlos B. Oliveira, Ana Maria Oliveira-Brett



PII: S1572-6657(17)30391-0
DOI: doi: [10.1016/j.jelechem.2017.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.030)
Reference: JEAC 3306

To appear in: *Journal of Electroanalytical Chemistry*

Received date: 21 March 2017

Revised date: 5 May 2017

Accepted date: 16 May 2017

Please cite this article as: Isabel P.G. Fernandes, Bárbara V. Silva, Bianca N.M. Silva, Angelo C. Pinto, Severino Carlos B. Oliveira, Ana Maria Oliveira-Brett, Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1-methyl, and their halogenated derivatives, redox behaviour, *Journal of Electroanalytical Chemistry* (2017), doi: [10.1016/j.jelechem.2017.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.030)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1-methyl, and their halogenated derivatives, redox behaviour

Isabel P.G. Fernandes¹, Bárbara V. Silva², Bianca N.M. Silva², Angelo C. Pinto²,
Severino Carlos B. Oliveira^{1,3}, Ana Maria Oliveira-Brett^{1*}

¹Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra,
3004-535, Coimbra, Portugal

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, 21945-970, Rio de Janeiro, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
52171-900, Recife, PE, Brazil

* brett@ci.uc.pt

Ana Maria Oliveira-Brett

Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia,

Universidade de Coimbra,

3004-535 Coimbra, Portugal

Tel/FAX: +351-239-835295

ABSTRACT

Isatin methyl derivatives have several pharmacotherapeutic applications, such as antibacterial, antifungal, antiviral, anticonvulsants and anticancer activities. The electrochemical behaviours of thirteen isatin-substituted derivatives with different functional groups, such as isatin 1-morpholinomethyl, isatin 1-hydroxymethyl, and isatin 1-, 5- or 7-methyl, and their halogenated derivatives, in phosphate buffer pH = 7.2, at a glassy carbon electrode, by cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, were investigated. The oxidation mechanism of all isatin derivatives occurred in two consecutive irreversible charge transfer pH-dependent reactions. The first anodic reaction was on the benzene ring, with the generation of one hydroxyl group attached to the ring, which was oxidized in the second step to *para*- and/or *ortho*-quinone derivatives, and/or polymeric products. The reduction mechanism of all isatin derivatives, was an irreversible cathodic process, dependent on pH and the presence/absence of attached halogenated groups. The isatin derivatives reduction, in the absence of halogens, caused the irreversible cleavage of the carbonyl group, at the position C3, in the heterocyclic ring, and, in the presence of halogens, the cathodic peak corresponded to the carbon-halogen bond reduction. The functional groups attached to the isatin ring at the 1-position, morpholinomethyl-, hydroxymethyl- and methyl- are not electroactive, and do not affect considerably the isatin derivatives redox mechanism, since the oxidation occurs at the benzene ring, and the reduction at the carbonyl C3-position.

Keywords: Isatin derivatives, morpholinomethyl, hydroxymethyl, methyl, redox behaviour, glassy carbon, voltammetry.

1. Introduction

The development of new drugs, derived from the study of natural compounds, or from compounds designed and synthesized, is most relevant in chemical research. A great diversity of aromatic heterocyclic organic compounds, such as indole, for the developing of molecules with important biological properties, have been investigated [1].

Isatin (1H-indole-2,3-dione), ISA, **Scheme 1**, is an endogenous indole present in mammalian tissues, and in nature [2,3]. ISA is one of the most interesting indole derivatives since it is a synthetically versatile substrate, starting material, and intermediate, which can be used for the synthesis of a large variety of new ISA derivatives [4-7], with a broad pharmacological profile and clinical applications [8-22]. Mainly due to ISA easy synthesis and selective functionalization, many pharmaceutically active compounds possess the ISA ring in its structure.

In recent years, ISA and derivatives have been identified as antibacterial and antifungal agents [10], anticonvulsant [11], antitubercular [12], antiviral [13], and also have sedative/hypnotic properties, causing some positive effects on sleep disorders, that could be translated into an alternative choice for the pre-anesthesia, or maintenance of anesthesia [14].

Among the ISA functional derivatives 1-substituted compounds are most interesting because of their wide applications in the organic synthesis of versatile new ISA derivatives [15]. Schiff and Mannich bases of ISA that possess the morpholinomethyl ring substituent in 1- position, showed antibacterial and antifungal activity [16]. A preliminary study of cytotoxic activity of some metal complexes derived from ISA, also with morpholinomethyl ring, was performed against human epidermoid larynx carcinoma cell lines, and the results showed high toxic activity, causing cell death [17]. Some ISA 1-methyl derivatives are

reported to exhibit a broad-spectrum activity and can also be used for the development of new anticonvulsants [18].

ISA derivatives also possess anticancer properties [19-21]. One example of an important isatin derivative is the 5-fluoro-isatin, used in the synthesis of the anticancer agent sunitinib maleate, approved by FDA for the treatment of renal cell carcinoma (RCC), and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumour (GIST) [22].

The electron transfer reactions, *in vitro* at the electrode surface, and in the organism, may share related principles, and can clarify *in vivo* drug activity, stereochemistry, diffusion, solubility and metabolism. Therefore, considering that many physiological processes include oxidation-reduction reactions, it is easy to find connections between electrochemical and biological reactions regarding electron transfer pathways [23-27]. The redox reactions occur at very positive potentials and can only be studied using carbon electrodes [23-27].

The redox mechanisms of ISA and some derivatives, in aqueous and non-aqueous media, using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry at glassy carbon or mercury electrodes, have been investigated [28-33]. Several ISA nitro-derivatives electrochemical behaviour, using glassy carbon electrode, were investigated [32]. The hydrazone, semicarbazone and nitro groups attached to the ISA ring structure, showed different and separate oxidation and reduction mechanisms, and these derivatives presented new redox properties when compared with ISA [32]. The hydrazone and semicarbazone groups increased the ISA electron-donor character, whereas the nitro group increased the ISA electron acceptor character [32]. The electrochemical behaviour of a group of eleven ISA halogen-derivatives, using glassy carbon electrode, was also investigated [33], and the halogen groups attached to the ISA benzene ring strongly influenced the oxidation and reduction mechanisms, and new redox processes, when compared with ISA, occurred. The monohalogen substitutions, attached to the ISA benzene ring at C5 or C7 position, increased

the ISA electron-donor character, while the dihalogen substitutions, attached to the ISA benzene ring at C5, C7 or C4, C6, decreased the ISA electron-donor character [33]. Since ISA 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl and 1-methyl derivatives, are having increasing applications, as new molecules with pharmaceutical interest, the investigation of their *in vitro* redox properties is very important, in order to predict the *in vivo* redox processes.

The main objective of the present study was focused on the redox behaviour of thirteen isatin 1-substituted, with the morpholinomethyl ring, hydroxymethyl, and methyl groups, and their halogenated derivatives, **Scheme 1**. The ISA molecule substituents, at the 1-position, influence in its redox properties, for a wide range of solution conditions, using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, at a glassy carbon electrode, was investigated. A redox mechanism was proposed, that may play a crucial role in understanding several ISA derivatives properties, as well as in their metabolism in biological systems.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

The ISA and all thirteen ISA substituted derivatives with different functional groups, 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their halogenated derivatives, were synthesized [34-39], **Scheme 1**. Stock solutions of ISA and all ISA derivatives, with a concentration of 1 mM, in ethanol, were prepared and stored at 4 °C, and solutions of different concentrations, by dilution, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.2, were prepared.

All analytical grade reagent solutions were prepared using purified water from a Millipore Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Nitrogen saturated solutions were obtained by bubbling high purity N₂ for a minimum of 10 min in the solution, and continuing with a N₂ flow over the solution during the voltammetric experiments.

Microvolumes were measured using electronic pipettes (EP), EP-10 μM and EP-100 μM Plus Motorized (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, USA). The pH measurements were carried out with a Crison micropH 2001 pH-meter with an Ingold combined glass electrode.

All experiments were done at room temperature, $T = 298$ K, and in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.2.

2.2 Voltammetric parameters and electrochemical cells

Voltammetric experiments were carried out using a μAutolab running with GPES 4.9 software, Metrohm/Autolab, Utrecht, The Netherlands. Measurements were carried out using a glassy carbon working electrode (GCE) ($d = 1.5$ mm), a Pt wire counter electrode, and an Ag/AgCl (3 M KCl) as reference electrode, in a 1 mL one-compartment electrochemical cell (eDAQ, Europe). The experimental conditions for cyclic voltammetry (CV) were scan rate 100 mV/s, and for differential pulse (DP) voltammetry were: pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, and scan rate 5 mV/s. For square wave (SW) voltammetry the experimental conditions were frequency 25 Hz and potential increment 2 mV, corresponding to an effective scan rate of $v_{\text{eff}} = 50$ mV/s.

The GCE was polished using diamond spray (particle size 1 μm, Kement, Kent, UK) before every electrochemical assay. After polishing, the electrode was rinsed thoroughly with Milli-Q water. Following this mechanical treatment, the GCE was placed in buffer supporting electrolyte and various voltammograms were recorded until a steady state baseline voltammogram was obtained. This procedure ensured very reproducible experimental results.

2.3 Acquisition and presentation of voltammetric data

All DP voltammograms presented were baseline-corrected using the moving average application with a step window of 2 mV included in the GPES version 4.9 software. This mathematical treatment improved the visualization and identification of peaks over the baseline without introducing any artefact, although the peak current is in some cases reduced (<10 %) relative to that of the untreated curve. Nevertheless, this mathematical treatment of the original DP voltammograms was used in the presentation of all experimental DP voltammograms for a better and clearer identification of the peaks.

3. Results and Discussion

The electrochemical behaviour of ISA and thirteen ISA substituted derivatives, **Scheme 1**, 1-morpholinomethyl-ISA, 1-morpholinomethyl-5-iodo-ISA, 1-morpholinomethyl-5-fluoro-ISA, 1-morpholinomethyl-5-bromo-ISA, 1-morpholinomethyl-6-fluoro-ISA, **Fig. 1**, 1-hydroxymethyl-ISA, 1-hydroxymethyl-5-bromo-ISA, 3-hydroxy-ISA, **Fig. 4**, 1-methyl-ISA, 1-methyl-5-chloro-ISA, 5-methyl-ISA, 7-methyl-ISA and 5-chloro-7-methyl-ISA, **Fig. 6**, in phosphate buffer pH = 7.2, N₂ saturated solutions, by CV, scan rate 100 mV/s, at GCE, was investigated. During all voltammetric measurement a constant flux of N₂ was kept over the solution surface, in order to avoid the diffusion of atmospheric oxygen into the electrolyte solutions.

All ISA-substituted derivatives were electroactive and oxidation and reduction peaks were detected, **Figs. 1, 4 and 6, Tables 1 and 2**. However, for all isatin derivatives the anodic and the cathodic processes were independent of each other, so they were investigated separately.

3.1. Oxidation

The oxidation mechanisms of ISA and the thirteen ISA substituted derivatives with different functional groups, 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their halogenated derivatives, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.2, by CV, DP and SW voltammetry, in the potential range of 0.0 V to + 1.3 V, at GCE, were investigated .

3.1.1. Isatin 1-morpholinomethyl derivatives

CVs of ISA and 1-morpholinomethyl-isatin (1-CH₂MPO-ISA) and their halogenated derivatives, are presented in **Fig. 1**, and the data summarized in **Table 1**.

CVs in ISA 500 μM, 1-CH₂MPO-5-I-ISA 175 μM, 1-CH₂MPO-5-Br-ISA 500 μM, and 1-CH₂MPO-5-F-ISA 340 μM, all presented two irreversible oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} \approx + 1.10$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} \approx + 1.20$ V. CVs in 1-CH₂MPO-ISA 500 μM and of 1-CH₂MPO-6-F-ISA 190 μM, showed in the first scan only one irreversible oxidation peak, peak 1a, at $E_{p1a} \approx + 1.08$ V. Successive CVs showed a great decrease of all the oxidation peak currents, due to the adsorption of oxidation products on the GCE surface, **Fig. 1**.

The influence of CV scan rate, on the oxidation of 1-CH₂MPO-ISA, at GCE, was investigated [23,40]. The GCE was immersed in a solution of 1-CH₂MPO-ISA 500 μM, and the CVs were recorded at 5 till 100 mV/s scan rates. After each measurement, the electrode surface was always polished in order to assure a clean GCE surface, and to avoid possible problems from adsorption of 1-CH₂MPO-ISA oxidation products onto the GCE. Increasing the scan rate the peak 1a current increased linearly with square root of scan rates, which is consistent with the diffusion-controlled oxidation process [23,40], in agreement with the highly hydrophilic character of MPO in physiological medium [41], showing that the

1-CH₂MPO group, attached at 1-position, changed ISA hydrophobic characteristics [32, 33] to hydrophilic.

Successive DP voltammograms were recorded in 1-CH₂MPO-ISA 20 μM, **Fig. 2**. The electrooxidation of 1-CH₂MPO-ISA occurred in one single step, peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.08$ V, in agreement with the CV results, **Fig. 1B**. However, in a second DP scans, two new anodic peaks were detected, peak 3a, at $E_{p3a} = + 0.32$ V, and peak 4a, at $E_{p4a} = + 0.56$ V, and their peak currents increased in subsequent scans, **Fig. 2**. These peaks correspond to the oxidation of the 1-CH₂MPO-ISA oxidation products, very similar to the ISA oxidation, at GCE surface [32,33], that proceeds in successive steps on the benzene ring. Moreover, considering the anodic peaks 3a and 4a, the anodic peak 2a occurred at very high positive potential, near the potential corresponding to oxygen evolution, and consequently was not clearly detected by DP voltammetry.

The SW voltammetric behaviour of 1-CH₂MPO-ISA, at an effective scan rate of $v_{\text{eff}} = 50$ mV/s, was investigated, **Figs. 3A** and **3B**. The important advantages of SW voltammetry in relation to DP voltammetry include minimization of problems with poisoning of the electrode surface, and analysis of the electrochemical reversibility of the electron transfer reaction, running only one scan [23].

The first SW voltammogram for a 1-CH₂MPO-ISA 100 μM solution showed comparable features to the CV and DP voltammograms, **Figs. 1B and 2**, presenting only one irreversible oxidation peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.20$ V, confirmed plotting the forward and backward components of the total current, **Fig. 3A**. The second SW voltammogram showed similar features to the DP voltammograms, **Fig. 2**, two reversible oxidation peaks, peak 3a, at $E_{p3a} = + 0.33$ V, and peak 4a, at $E_{p4a} = + 0.60$ V, **Fig. 3B**, corresponding to the reversible oxidation of the 1-CH₂MPO-ISA oxidation products, **Fig. 3B**.

The oxidation of isatin 1-morpholinomethyl derivatives was similar to the ISA oxidation at GCE [32,33], **Table 1**. The presence of the MPO ring in the ISA structure did not cause a significant change in the derivatives oxidation peak potentials, except for 1-CH₂MPO-5-Br-ISA, which is oxidized more easily, at lower positive potentials, due to the presence of halogen bromine in the C5-position.

The oxidation of 1-CH₂MPO-ISA and of isatin MPO-halogen derivatives, with the MPO group attached always at 1-position, and one halogen attached at C5-position (I, F or Br) or C6-position (F), **Scheme 1, Fig. 1** and **Table 1**, followed a similar oxidation behaviour.

The oxidation mechanism of isatin MPO-derivatives, in physiological media pH = 7.2, was proposed, **Scheme 2**, comparing their chemical properties, and their CV, DP, and SW voltammograms, with ISA, ISA nitro-derivatives, ISA halogen-derivatives [29,32,33], and phenolic compounds [26,42], oxidation mechanisms.

The oxidation reactions in isatin 1-CH₂MPO or 1-CH₂MPO-5- or 6-halogen derivatives proceeded in successive steps on the benzene ring. In the first oxidation, one electron was removed from the benzene, peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.20$ V, with subsequent deprotonation and nucleophilic attack by water, with the electrogeneration of the 1-CH₂MPO-7-hydroxy-ISA/1-CH₂MPO-4-hydroxy-ISA or 1-CH₂MPO-5-halogen-7-hydroxy-ISA or 1-CH₂MPO-4-hydroxy-7-halogen-ISA. The second anodic process, peak 2a, corresponded to the oxidation of the -OH group, produced in the first electron transfer step.

The reversible electroactive -OH group oxidation products formed, in the second scan, were oxidised at lower oxidation potentials, peak 3a, at $E_{p3a} = + 0.33$ V, *para*-quinone derivative, and peak 4a, at $E_{p4a} = + 0.60$ V, *ortho*-quinone derivative, **Fig. 3**. In the second anodic process other pathway, peak 2a, the -OH group oxidation gives rise to polymeric products, which are not electroactive, and strongly adsorb on the GCE surface, are produced, **Scheme 2** [32].

3.1.2. Isatin 1-hydroxymethyl derivatives

Successive CVs, at GCE, in 1-hydroxymethyl-ISA (1-CH₂OH-ISA) 230 μM, 1-hydroxymethyl-5-bromo-ISA (1-CH₂OH-5-Br-ISA) 260 μM, and 3-hydroxyl-ISA (3-OH-ISA) 300 μM, were carried out to study the influence of the hydroxyl and hydroxymethyl substituents on the oxidation of ISA, and compared with the anodic behaviour of ISA, **Fig. 4** and **Table 1**.

Two consecutive irreversible oxidation peak 1a, at $E_{p1a} \approx + 1.08$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} \approx + 1.20$ V, occurred in the first CV scan, in 1-CH₂OH-ISA 230 μM and 1-CH₂OH-5-Br-ISA 260 μM, scanning in the negative direction, no reduction peaks were observed, **Figs. 4B** and **4C**. In the second scan, the 1-CH₂OH-ISA and of 1-CH₂OH-5-Br-ISA oxidation peak currents decreased, due to the oxidation products adsorption on the GCE surface, **Figs. 4B** and **4C**.

Concerning 3-OH-ISA, one irreversible oxidation peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.02$ V, was observed, **Fig. 4D**. On the second scan, without polishing the electrode surface, a new oxidation peak 3a, at $E_{p3a} \approx + 0.44$ V, related to the 3-OH-ISA oxidation product formed at peak 1a, occurred.

Successive DP voltammograms, in 1-CH₂OH-ISA 20 μM, were recorded, **Fig. 5**. The 1-CH₂OH-ISA oxidation occurs in the first scan at peak 1_a, at $E_{p1a} = + 1.10$ V, and peak 2_a at $E_{p2a} = + 1.26$ V, in agreement with the CV results, **Fig. 4B**. In the second DP voltammogram, two new peaks were detected, peak 3_a, at $E_{p3a} = + 0.30$ V, and peak 4_a, at $E_{p4a} = + 0.56$ V, and their current increased with increasing number of scans, **Fig. 5**.

The 1-CH₂OH-ISA, 1-CH₂OH-5-Br-ISA and 3-OH-ISA, with no substituents at the benzene ring, CV and DP voltammograms compared with ISA [32], **Fig. 4A**, and with the 1-CH₂MPO-ISA derivatives, **Figs. 1, 2** and **3**, clearly demonstrated that their oxidation

mechanism is similar with ISA, and all 1-CH₂OH-, 1-CH₂OH-5-Br-, and 3-OH- groups attached to ISA are not electroactive, in agreement with the benzene ring successive steps electrooxidation, **Scheme 2**.

3.1.3. Isatin methyl derivatives

Successive CVs, at GCE, of five methyl-ISA derivatives, 1-CH₃-ISA 500 μM, 1-CH₃-5-Cl-ISA 350 μM, 5-CH₃-ISA 190 μM, 7-CH₃-ISA 280 μM, and 5-Cl-7-CH₃-ISA 300 μM, were carried out to investigate the influence of the methyl group attached at different positions at the ISA molecule, N1-, 5C- or 7C-, in the absence and in the presence of Cl substituent at the C5-position, and compared with the anodic behaviour of ISA, and other ISA derivatives, **Scheme 1, Fig. 6 and Table 1**.

The CVs of all methyl-ISA derivatives showed two consecutive irreversible oxidation peaks, peak 1a, at $E_{p1a} \approx + 1.00$ V, and peak 2a, at $E_{p1a} \approx + 1.20$ V, **Fig. 6 and Table 1**. However, in 1-CH₃-5-Cl-ISA, the presence of the Cl at the C5-position in the benzene ring, considerably affected the oxidation process, **Fig 6C**, when compared with ISA and other methyl-ISA derivatives, **Fig. 6**. In the second CV, in the same solution, without cleaning the electrode surface, the 1-CH₃-ISA, 5-CH₃-ISA, 7-CH₃-ISA, and 5-Cl-7-CH₃-ISA oxidation peak currents, due to the oxidation products adsorption on the GCE surface, decreased, **Fig. 6**.

Successive DP voltammograms in 1-CH₃-ISA 50 μM, showed in the first scan oxidation peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.06$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} = + 1.24$ V, **Fig. 7**. In the second scan, two new peaks, due to the benzene ring oxidation products, *para*-quinone ISA derivatives, peak 4a, at $E_{p4a} = + 0.35$ V, and *ortho*-quinone ISA derivatives, peak 5a, at $E_{p5a} = + 0.58$ V, the peak currents increasing with the number of scans, were detected.

The 1-CH₃-ISA electrochemical oxidation was also investigated by SW voltammetry. The first SW voltammogram in 1-CH₃-ISA 100 μM, showed, as expected, two oxidation

steps, peak 1a, at $E_{p1a} = + 1.10$ V, and peak 2a, at $E_{p2a} = + 1.25$ V. In the second SW voltammogram two new peaks, peak 4a, at $E_{p4a} = + 0.34$ V, and peak 5a, at $E_{p5a} = + 0.55$ V, in agreement with DP voltammetry, were detected **Fig. 7**. Plotting the forward and backward of the total current of the second scan, the reversibility of the peaks 4a and 5a, and the irreversibility of the peaks 1a and 2a, was demonstrated.

The CV, DP and SW voltammograms showed that the oxidation mechanism of all methyl-ISA derivatives occurred, in successive steps, at the benzene ring, **Scheme 2**. It is also important to stress that the ISA anodic potentials are not affected by the methyl group substitution. However, some differences in peak currents in all oxidation processes were detected, showing a higher or a lower interaction between these compounds and the GCE surface, related with their, higher or lower, hydrophilic or hydrophobic properties.

3.1.4 Oxidation mechanism of isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl and 1-, 5- or 7-methyl derivatives

The oxidation mechanism of ISA, and ISA 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl and 1-, 5- or 7-methyl derivatives, is similar, and confirmed by CV, DP and SW voltammetry. In the first step, one electron is removed from the benzene ring, following deprotonation and direct nucleophilic attack by water, with the production of one hydroxyl-ISA derivative. In the second step, the -OH group oxidation products, reversible *para*- and *ortho*-quinone ISA derivatives, were formed, **Scheme 2**.

3.2 Reduction

The reduction mechanisms of ISA and the thirteen ISA substituted derivatives with different functional groups, 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their halogenated derivatives, in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.2, by CV, in the potential range of

0.0 V till -1.2 V, at GCE, in N₂ saturated solutions, were investigated, **Figs. 1, 4 and 6**, and **Table 2**.

The CVs in ISA 500 μM, 1-CH₂MPO-ISA 500 μM, 1-CH₂OH-ISA 230 μM, of 1-CH₃-ISA 500 μM, 5-CH₃-ISA 190 μM, and 7-CH₃-ISA 280 μM, showed one irreversible reduction peak 5c, at $E_{p5c} \approx -0.60$ V, all with a similar voltammetric profile, that correspond to the carbonyl group reduction, at the position C3 in the heterocyclic ring [29,32,33], **Figs. 1A, 1B, 4B, 6B, 6D, 6E**, and **Table 2**.

CVs obtained in ISA halogenated derivatives, 1-CH₂MPO-5-I-ISA 175 μM, 1-CH₂MPO-5-Br-ISA 500 μM, 1-CH₂MPO-5-F-ISA 340 μM, 1-CH₂MPO-6-F-ISA 190 μM, 1-CH₂OH-5-Br-ISA 260 μM, 1-CH₃-5-Cl-ISA 350 μM, and of 5-Cl-7-CH₃-ISA 300 μM, showed in the first scan one irreversible reduction peak 4c, **Figs. 1C-F, 4C, 6C, 6F**, and **Table 2**. In the second scan, the peak 4c current decreased, due to the ISA-derivatives reduction products strong adsorption on the GCE surface. Considering, the cathodic processes potential, the CV voltammograms, and the different halogen groups attached to the ISA molecule, the reduction peak 4c correspond to the electron transfer to the quinoid system, followed by the electron transfer to the C-halogen group, with subsequent cleavage of the carbon-halogen bond, at C5, C6 or C7 positions [33].

The electroreduction of 3-OH-ISA 300 μM, **Fig. 4E**, as expected, showed one very small cathodic peak since the C3-position was chemically reduced and no halogen group was attached to the benzene ring, in agreement and confirming the very important 3-OH-ISA electroreduction mechanism [29,32,33].

4. Conclusions

The electrochemical behaviour of a group of thirteen isatin substituted derivatives with different functional groups, 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their

halogenated derivatives, with a large spectrum in clinical applications, by CV, DP and SW voltammetry, in physiological media (pH = 7.2), phosphate buffer, using a GCE, was studied. The functional groups, morpholinomethyl, hydroxymethyl and methyl, attached at the isatin ring at the 1-position are not electroactive. These substituents do not affect the isatin electrooxidation, at the benzene ring, and the isatin electroreduction, at the carbonyl at C3-position, mechanisms. However, in the isatin derivatives with halogen groups attached, the cathodic peak corresponds to the carbon-halogen bond reduction. Furthermore, some small differences in all oxidation and reduction peak potentials, showing a higher or a lower interaction between the isatin derivatives and the GCE surface, due to their, higher or lower, hydrophilic or hydrophobic properties, were detected.

Acknowledgements

Financial support from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), grant SFRH/BD/87334/2012 (I.P.G. Fernandes), and project UID/EMS/00285/2013, FEDER funds through the program COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, projects Innovec'EAU (SOE1/P1/F0173), FACEPE-CNPq-BRAZIL (FACEPE-APQ-0535-1.06/14), (APQ/MCTI/CNPq/Universal/456725/2014-8) (S.C.B. Oliveira), CAPES-FAPERJ (Prêmio Capes Tese 383/2013; FAPERJ E-26/202.771/2015) (B.V. Silva), and CNPq Fellowship (B.N.M. Silva), are gratefully acknowledged.

References

- [1] V. Sharma, P. Kumar, D. Pathak, *J. Heterocyclic Chem.* **47** (2010) 491.
- [2] M. Yoshikawa, et al., *Chem. Pharm. Bull.* **46** (1998) 886.
- [3] P. Watkins, et al., *Neurochem. Int.* **17** (1990) 321.
- [4] J.F.M. da Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, *J. Brazil. Chem. Soc.* **12** (2001) 273.
- [5] V. Pawar, et al., *Bioorgan. Med. Chem.* **18** (2010) 3198.
- [6] B.V. Silva, *J. Brazil. Chem. Soc.* **24** (2013) 707.
- [7] M. Pal, N.K. Sharma, J.K. Priyanka, K.K. Jha, *J. Adv. Sci. Res.* **2** (2011) 35.
- [8] S.N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S.K. Sridhar, *Acta Pharmaceut.* **55** (2005) 27.
- [9] C.R. Prakash, S. Raja, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 6057.
- [10] A.A. Raj, R. Raghunathan, M.R. SrideviKumari, N. Raman, *Bioorgan. Med. Chem.* **11** (2003) 407.
- [11] S.N. Pandeya, A.S. Raja, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **5** (2002) 266.
- [12] T. Aboul-Fadl, F.A.S. Bin-Jubair, *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **1** (2010) 113.
- [13] S.N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath, E. DeClercq, *Eur. J. Pharm. Sci.* **9** (1999) 25.
- [14] G. Zapata-Sudo, et al., *Pharm. Biochem. Beh.* **86** (2007) 678.
- [15] P. Pakravan, S. Kashanian, M.M. Khodaei, F.J. Harding, *Pharmacol. Rep.* **65** (2013) 313.
- [16] S.S. Chhajed, M.S. Padwal, *Int. J. ChemTech Res.* **2** (2010) 209-213.
- [17] A.J. Abdulghani, N.M. Abbas, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011** (2011) Article ID 706262, 15 pages.
- [18] M. Verma, S.N. Pandeya, K.N. Singh, J.P. Stables, *Acta Pharm.* **54** (2004) 49.
- [19] P.S. Sukhramani, S.A. Desai, M.P. Suthar, *J. Pharm. Res.* **4** (2011) 124.
- [20] K.L. Vine, J.M. Locke, M.Ranson, S.G. Pyne, J.B. Bremner, *Bioinorgan. Med. Chem.* **15** (2007) 931.
- [21] L. Hou et al., *Eur. J. Pharmacol.* **589** (2008) 27.

- [22] R.R. Junior, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **356** (2007) 323.
- [23] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications ed., Oxford, **1993**.
- [24] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 1633.
- [25] S.C.B. Oliveira, et al., *J. Electroanal. Chem.* **746** (2015) 51-56.
- [26] I.P.G. Fernandes, et al., *Electroanalysis* **24** (2012) 618.
- [27] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Langmuir* **28** (2012) 4896.
- [28] G. Farnia, G. Capobianco, A. Romanin, *J. Electroanal. Chem.* **45** (1973) 397.
- [29] V.C. Diculescu, S. Kumbhat, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chim. Acta* **575** (2006) 190.
- [30] C. Karaaslan, S. Suzen, *Int. J. Electrochem.* **2011** (2011) Article ID 154804, 10 pages.
- [31] A. Yeagley, et al., *J. Electroanal. Chem.* **651** (2011) 228.
- [32] S.C.B. Oliveira et al., *J. Electroanal. Chem.* **689** (2013) 207.
- [33] I.P.G. Fernandes, et al., *J. Electroanal. Chem.* **780** (2016) 75.
- [34] C.S. Marvel, G.S. Hiers, *Org. Synth., Coll.* **1** (1941) 327-329.
- [35] A.A. Esmaili, S. Amini, A. Bodaghi, *Synlett* **9** (2007) 1452.
- [36] T. Aboul-Fadl, F.A. Mohammed, E.A. Hassan, *Arch. Pharm. Res.* **26** (2003) 778.
- [37] S.J. Garden, J.C. Torres, L.E. Silva; A.C. Pinto, *Synthetic Commun.* **28** (1998) 1679.
- [38] B.V. Silva, P.M. Esteves, A.C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* **22** (2011) 257.
- [39] W.G. Birolli, et al., *J. Braz. Chem. Soc.* *In press*.
- [40] N.L. Queiroz, et al., *Electroanalysis* **29** (2016) 489.
- [41] Y. Zhang, et al., *Chem. Commun.* **49**, (2013) 7286.
- [42] T.A. Enache, A.M. Oliveira-brett, *J Electroanal Chem.* **655** (2011) 9.

Table 1. Isatin derivatives oxidation potentials obtained by CV, pH = 7.2.

Isatin Derivatives	Potential / V (vs. Ag/AgCl)
ISA	$E_{p1a} = + 1.10 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.24 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-ISA	$E_{p1a} = + 1.08 \text{ V}$ —
1-CH ₂ MPO-5-I-ISA	$E_{p1a} = + 1.05 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.19 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-5-F-ISA	$E_{p1a} = + 1.00 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.22 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-5-Br-ISA	$E_{p1a} = + 0.90 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.05 \text{ V}$
1-CH ₂ MPO-6-F-ISA	$E_{p1a} = + 1.10 \text{ V}$ —
1-CH ₂ OH-ISA	$E_{p1a} = + 1.09 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.24 \text{ V}$
1-CH ₂ OH-5-Br-ISA	$E_{p1a} = + 1.06 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.19 \text{ V}$
3-OH-ISA	$E_{p1a} = + 1.04 \text{ V}$ —
1-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1.09 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.23 \text{ V}$
1-CH ₃ -5-Cl-ISA	$E_{p1a} = + 0.86 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.20 \text{ V}$
5-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1.04 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.13 \text{ V}$
7-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1.01 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.13 \text{ V}$
5-Cl-7-CH ₃ -ISA	$E_{p1a} = + 1.00 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 1.11 \text{ V}$

Table 2. Isatin derivatives reduction potentials obtained by CV, pH = 7.2.

Isatin Derivatives	Potential / V (vs. Ag/AgCl)
ISA	$E_{p5c} = -0.58$ V
1-CH ₂ MPO-ISA	$E_{p5c} = -0.51$ V —
1-CH ₂ MPO-5-I-ISA	$E_{p4c} = -0.46$ V —
1-CH ₂ MPO-5-Br-ISA	$E_{p4c} = -0.45$ V —
1-CH ₂ MPO-5-F-ISA	$E_{p4c} = -0.51$ V —
1-CH ₂ MPO-6-F-ISA	$E_{p4c} = -0.59$ V —
1-CH ₂ OH-ISA	$E_{p5c} = -0.59$ V —
1-CH ₂ OH-5-Br-ISA	$E_{p4c} = -0.46$ V $E_{p5c} = -0.74$ V
3-OH-ISA	$E_{p5c} = -0.57$ V —
1-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = -0.59$ V —
1-CH ₃ -5-Cl-ISA	$E_{p4c} = -0.60$ V —
5-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = -0.60$ V —
7-CH ₃ -ISA	$E_{p5c} = -0.58$ V —
5-Cl-7-CH ₃ -ISA	$E_{p4c} = -0.46$ V —

Figures

Scheme 1. Chemical structures of ISA and thirteen ISA substituted derivatives with different functional groups: 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their halogenated derivatives.

Scheme 2. Proposed oxidation mechanism of ISA 1-morpholinomethyl-derivative.

Fig. 1. CVs, in N₂ saturated supporting electrolyte (•••) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μM, (B) 1-CH₂MPO-ISA 500 μM, (C) 1-CH₂MPO-5-I-ISA 175 μM, (D) 1-CH₂MPO-5-Br-ISA 500 μM, (E) 1-CH₂MP-5-F-ISA 340 μM, and (F) 1-CH₂MPO-6-F-ISA 190 μM. (—) first and (—) second scans, $v = 100$ mV/s.

Fig. 2. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₂MPO-ISA 20 μM (—) first, (—) second and (—) third scans, $v = 5$ mV/s.

Fig. 3. SW voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer pH = 7.2 of 1-CH₂MPO-ISA 100 μM: (A) first and (B) sixth scans; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, pulse amplitude 50 mV, $v_{\text{eff}} = 50$ mV/s; (—) I_t – total current, (—) I_f – forward current, (—) I_b – backward current.

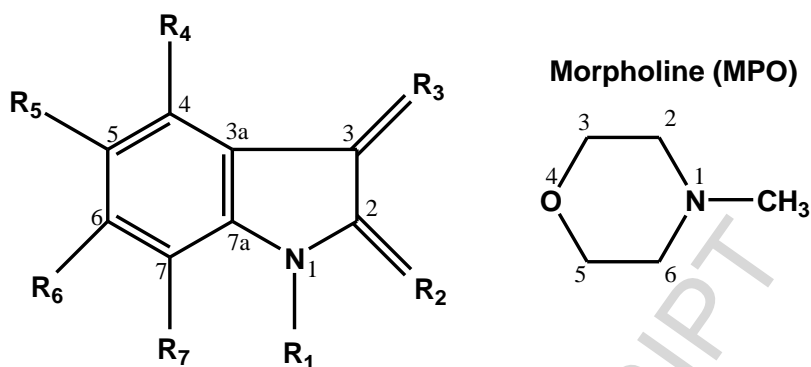
Fig. 4. CVs, in N₂ saturated supporting electrolyte (•••) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μM, (B) 1-CH₂OH-ISA 230 μM, (C) 1-CH₂OH-5-Br-ISA 260 μM, and (D) 3-OH-ISA 300 μM. (—) first and (—) second scans, $v = 100$ mV/s.

Fig. 5. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₂OH-ISA 20 μM (—) first, (—) second and (—) third scans, $v = 5$ mV/s.

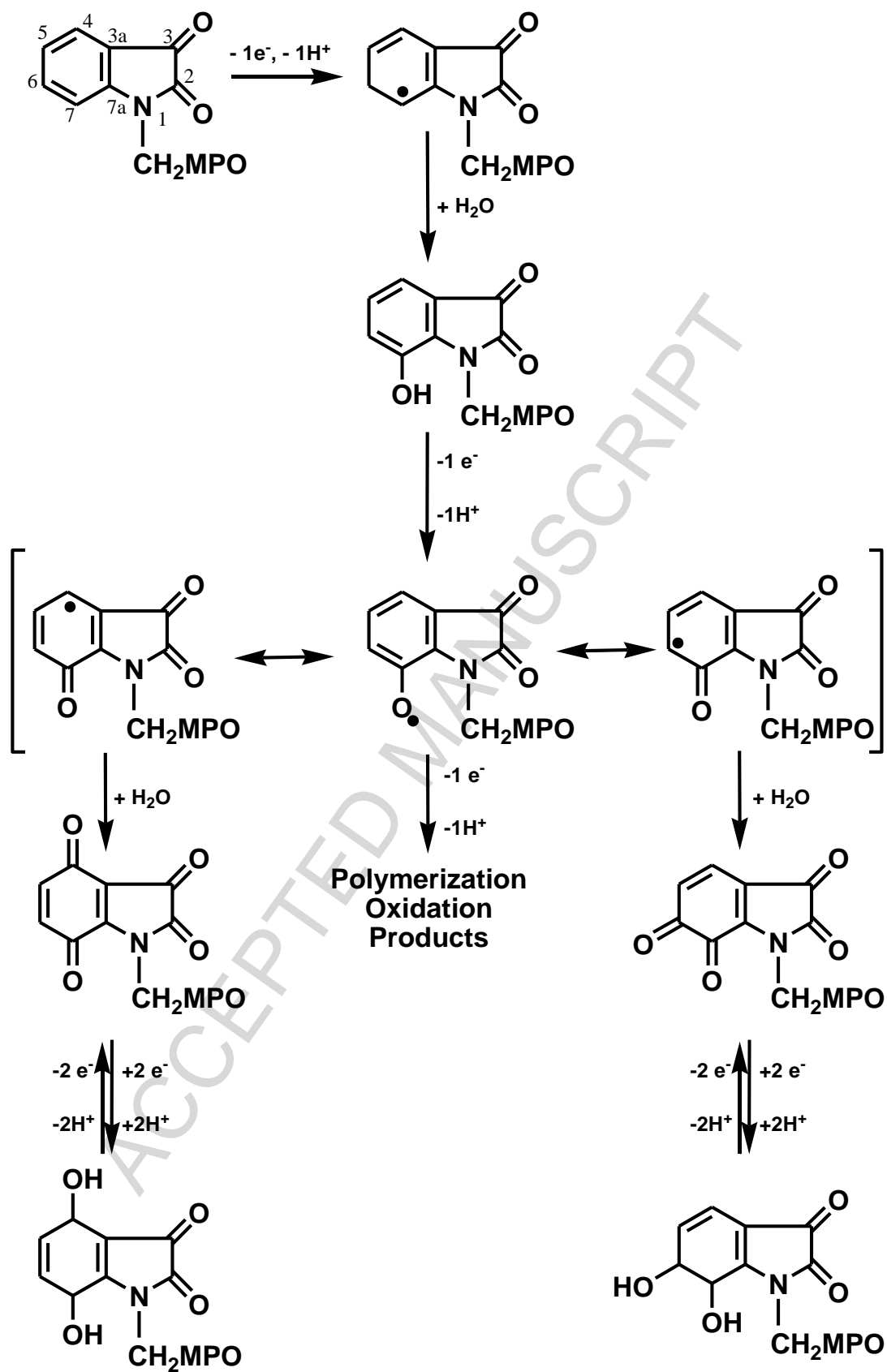
Fig. 6. CVs, in N₂ saturated supporting electrolyte (•••) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μM, (B) 1-CH₃-ISA 500 μM, (C) 1-CH₃-5-Cl-ISA 350 μM, (D) 5-CH₃-ISA 190 μM, (E) 7-CH₃-ISA 280 μM, and (F) 5-Cl-7-CH₃-ISA 300 μM. (—) first and (—) second scans, $v = 100$ mV/s.

Fig. 7. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₃-ISA 50 μM (—) first, (—) second, (—) third and (—) fourth scans, $v = 5$ mV/s.

Scheme 1. Chemical structures of ISA and thirteen ISA substituted derivatives, with different functional groups: 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl, 1, 5 or 7-methyl and their halogenated derivatives.



CONPOUNDS	Abbreviations	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
isatin	ISA	H	O	O	H	H	H	H
1-morpholinomethyl-isatin	1-CH ₂ MPO-ISA	CH ₂ MPO	O	O	H	H	H	H
1-morpholinomethyl-5-iodo-isatin	1-CH ₂ MPO-5-I-ISA	CH ₂ MPO	O	O	H	I	H	H
1-morpholinomethyl-5-fluoro-isatin	1-CH ₂ MPO-5-F-ISA	CH ₂ MPO	O	O	H	F	H	H
1-morpholinomethyl-5-bromo-isatin	1-CH ₂ MPO-5-Br-ISA	CH ₂ MPO	O	O	H	Br	H	H
1-morpholinomethyl-6-fluoro-isatin	1-CH ₂ MPO-6-F-ISA	CH ₂ MPO	O	O	H	H	F	H
1-hydroxymethyl-isatin	1-CH ₂ OH-ISA	CH ₂ OH	O	O	H	H	H	H
1-hydroxymethyl-5-bromo-isatin	1-CH ₂ OH-5-Br-ISA	CH ₂ OH	O	O	H	Br	H	H
3-hydroxy-isatin	3-OH-ISA	H	O	OH	H	H	H	H
1-methyl-isatin	1-CH ₃ -ISA	CH ₃	O	O	H	H	H	H
1-methyl-5-chloro-isatin	1-CH ₃ -5-Cl-ISA	CH ₃	O	O	H	Cl	H	H
5-methyl-isatin	5-CH ₃ -ISA	H	O	O	H	CH ₃	H	H
7-methyl-isatin	7-CH ₃ -ISA	H	O	O	H	H	H	CH ₃
5-chloro-7-methyl-isatin	5-Cl-7-CH ₃ -ISA	H	O	O	H	Cl	H	CH ₃



Scheme 2. Proposed oxidation mechanism of ISA 1-morpholinomethyl-derivative.

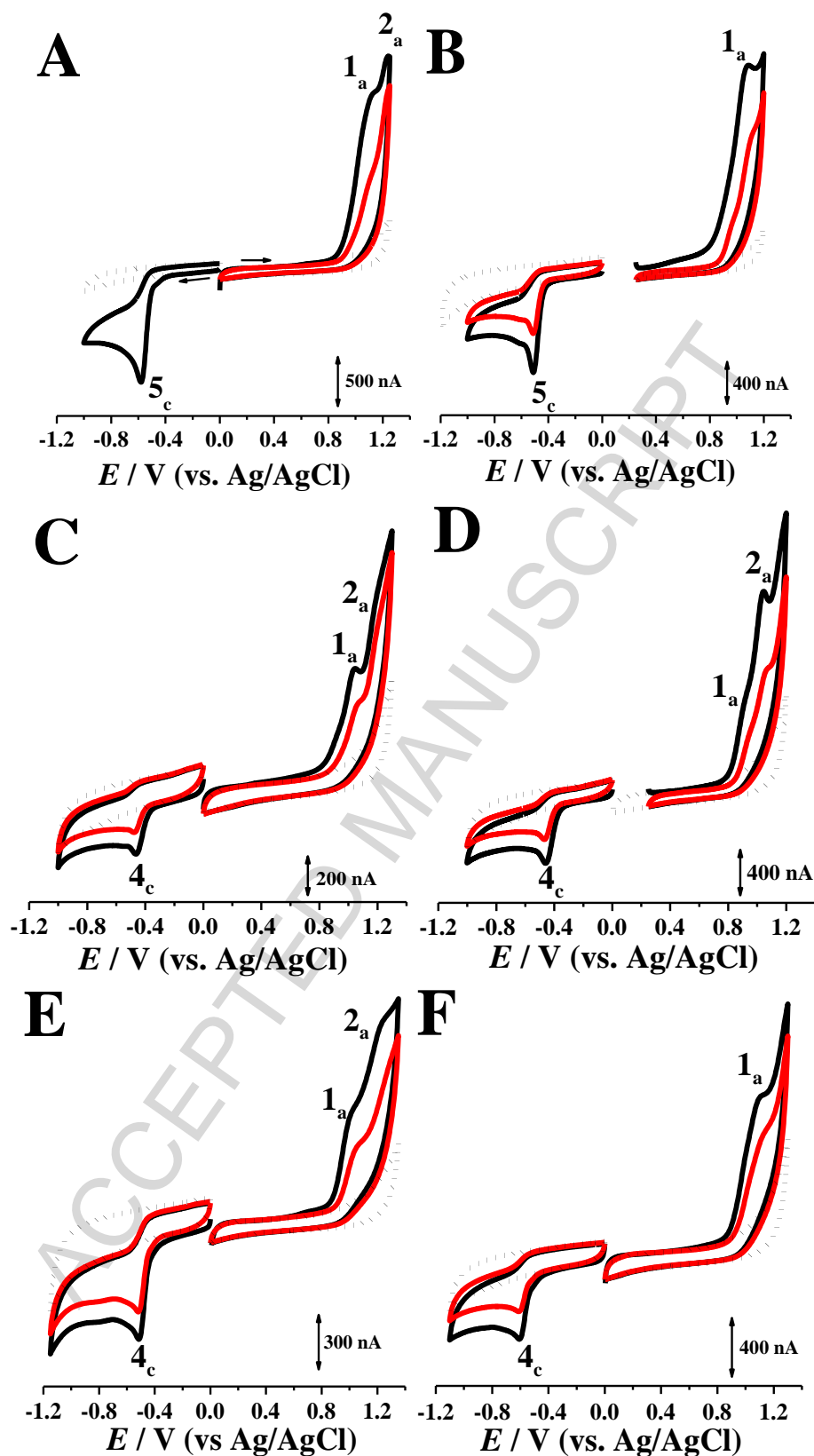


Fig. 1. CVs, in N_2 saturated supporting electrolyte (•••) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μ M, (B) 1-CH₂MPO-ISA 500 μ M, (C) 1-CH₂MPO-5-I-ISA 175 μ M, (D) 1-CH₂MPO-5-Br-ISA 500 μ M, (E) 1-CH₂MP-5-F-ISA 340 μ M, and (F) 1-CH₂MPO-6-F-ISA 190 μ M. (—) first and (—) second scans, $v = 100$ mV/s.

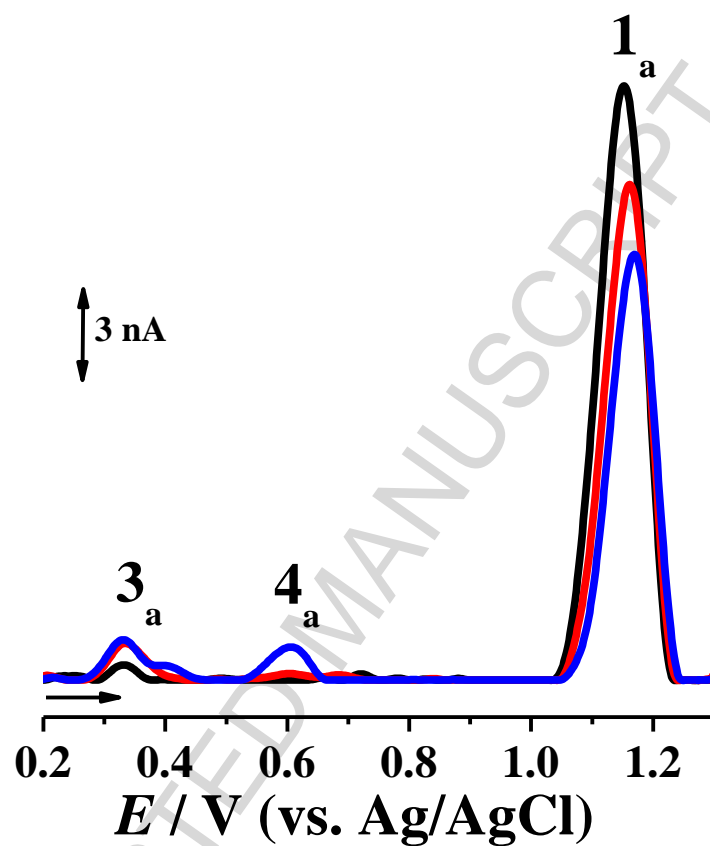


Fig. 2. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₂MPO-ISA 20 μ M (—) first, (—) second and (—) third scans,

$v = 5$ mV/s.

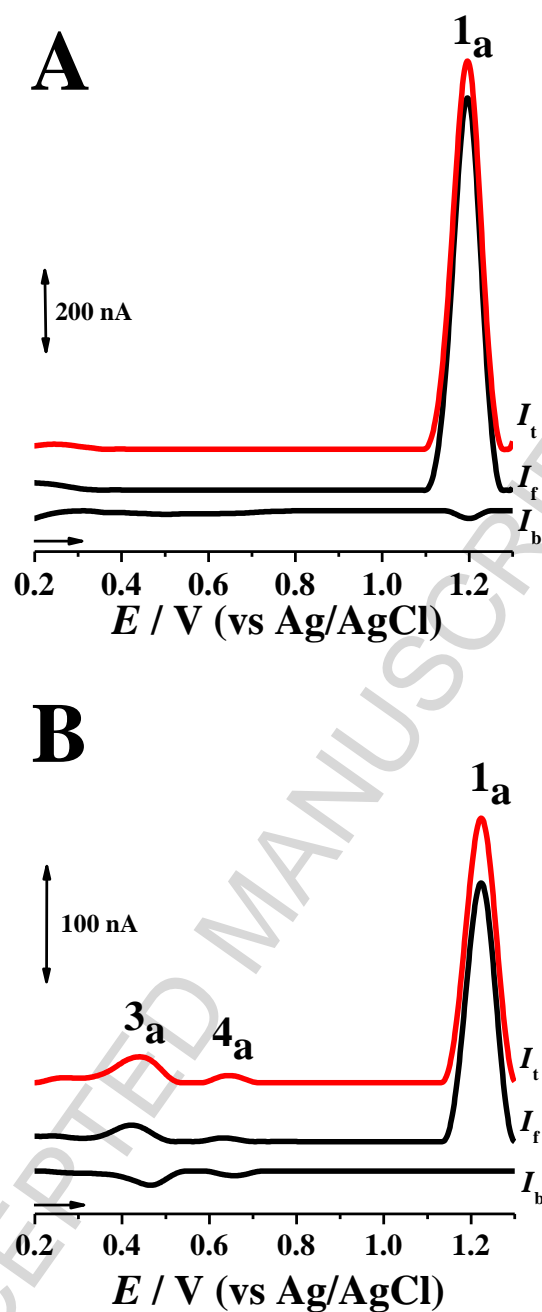


Fig. 3. SW voltammograms (baseline corrected), in phosphate buffer pH = 7.2, of 1-CH₂MPO-ISA 100 μ M: (A) first and (B) sixth scans; $f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, pulse amplitude 50 mV, $v_{\text{eff}} = 50$ mV/s; (—) I_t – total current, (—) I_f – forward current, (—) I_b – backward current.

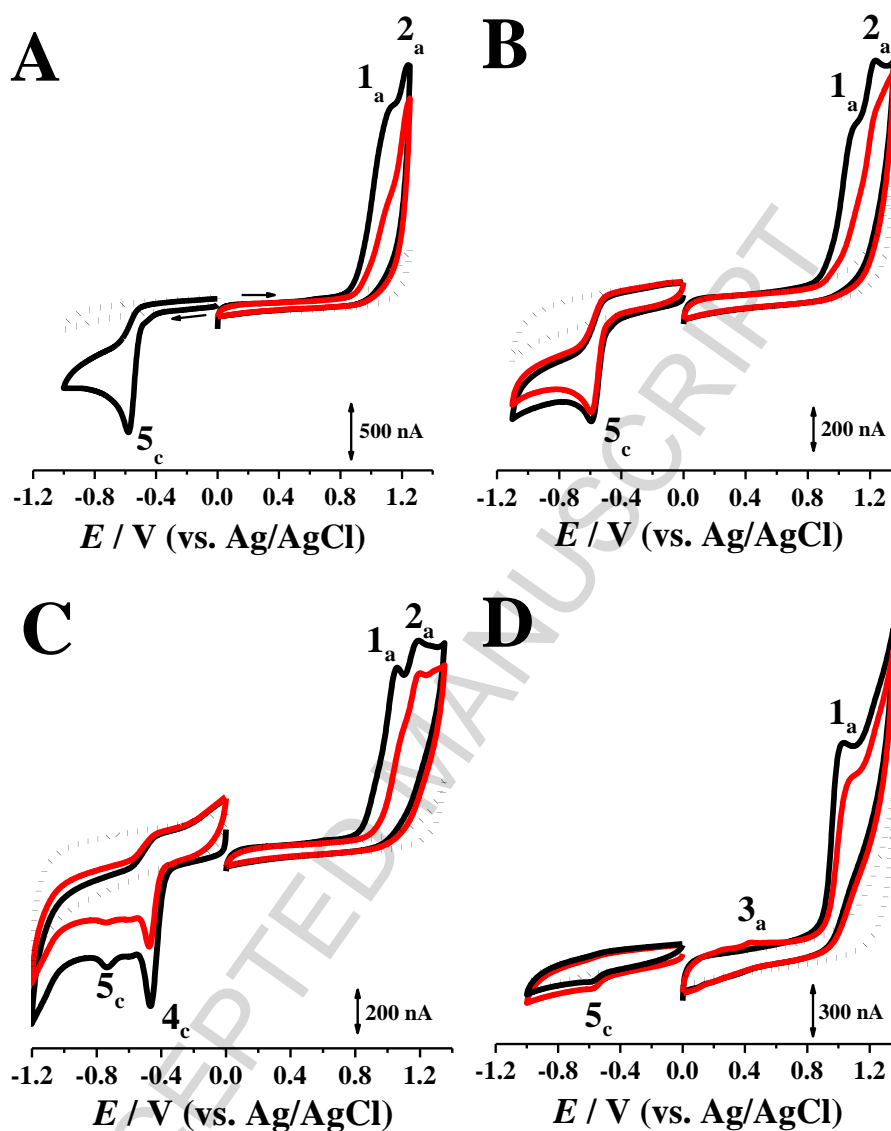


Fig. 4. CVs, in N_2 saturated supporting electrolyte (•••) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μ M, (B) 1-CH₂OH-ISA 230 μ M, (C) 1-CH₂OH-5-Br-ISA 260 μ M, and (D) 3-OH-ISA 300 μ M. (—) first and (—) second scans, $v = 100$ mV/s.

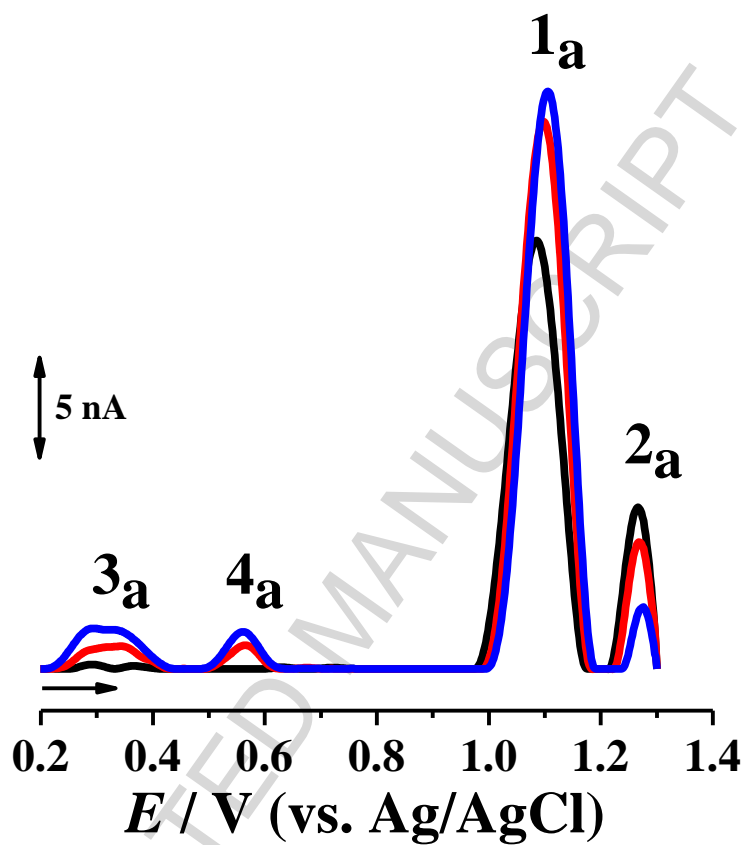


Fig. 5. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₂OH-ISA 20 μ M (—) first, (—) second and (—) third scans, $v = 5$ mV/s.

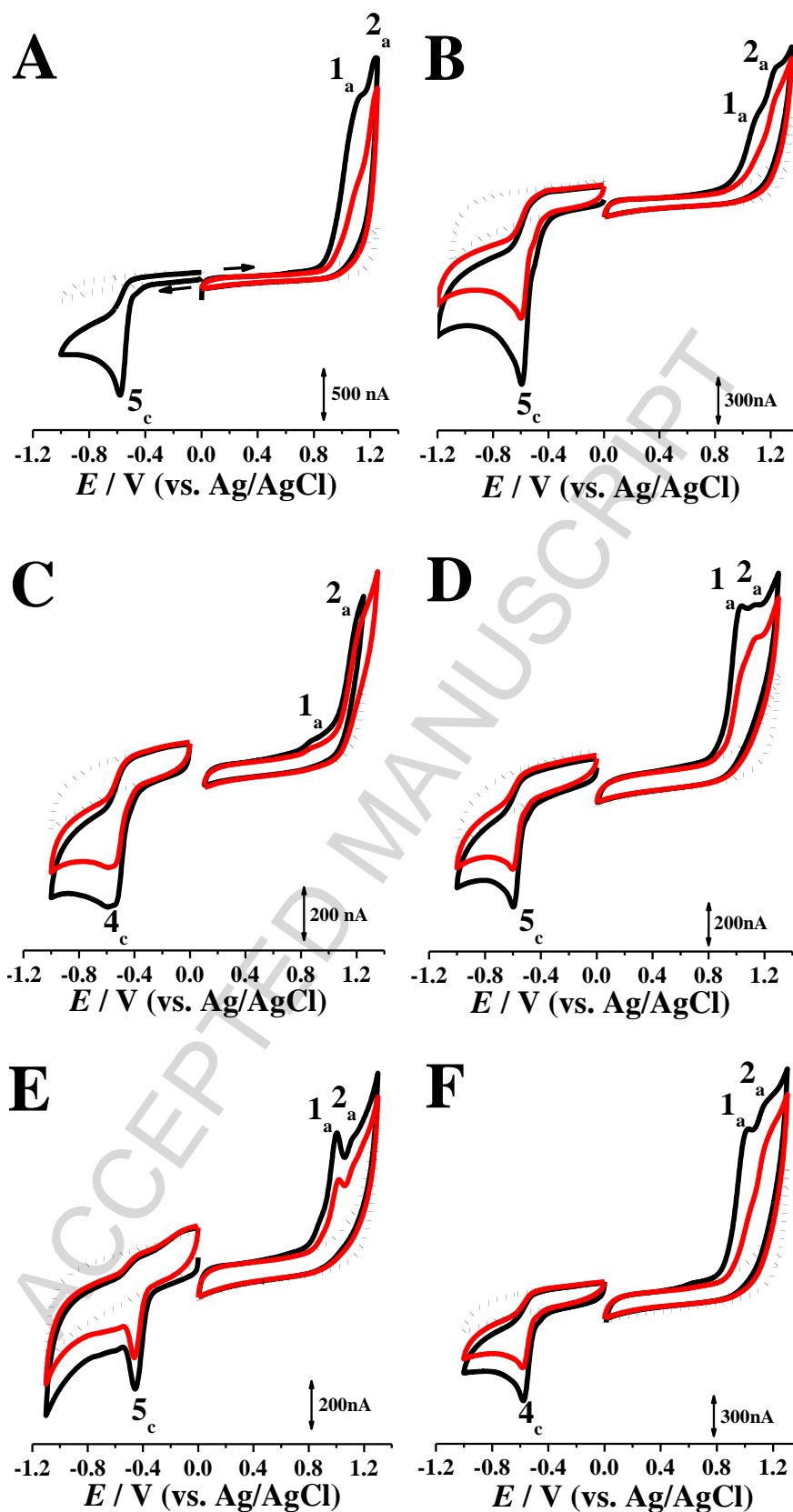


Fig. 6. CVs in N_2 saturated supporting electrolyte ($\bullet\bullet\bullet$) phosphate buffer pH = 7.2: (A) ISA 500 μ M, (B) 1-CH₃-ISA 500 μ M, (C) 1-CH₃-5-Cl-ISA 350 μ M, (D) 5-CH₃-ISA 190 μ M, (E) 7-CH₃-ISA 280 μ M, and (F) 5-Cl-7-CH₃-ISA 300 μ M. (—) first and (---) second scans, $v = 100$ mV/s.

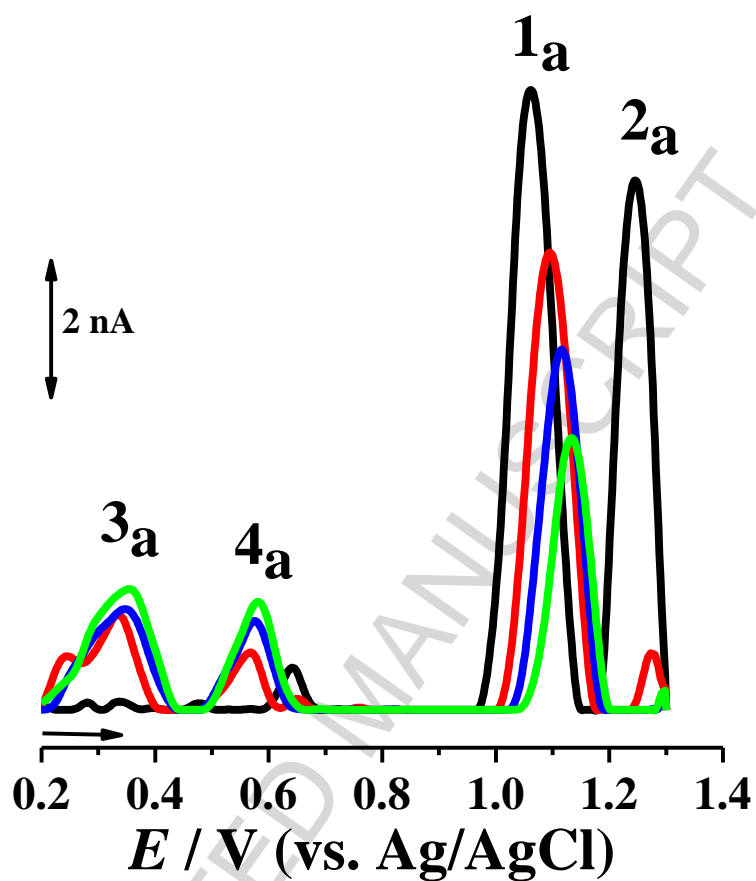


Fig. 7. Successive DP voltammograms (baseline corrected) in phosphate buffer, pH = 7.2, of 1-CH₃-ISA 50 μ M (—) first, (—) second, (—) third and (—) fourth scans, $v = 5$ mV/s.

**Isatin 1-morpholinomethyl, 1-hydroxymethyl 1-methyl, and
their halogenated derivatives, redox behaviour**

Isabel P.G. Fernandes¹, Bárbara V. Silva², Bianca N.M. Silva², Angelo C. Pinto²,
Severino Carlos B. Oliveira^{1,3}, Ana Maria Oliveira–Brett^{1*}

¹Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra,
3004-535, Coimbra, Portugal

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, 21945-970, Rio de Janeiro, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
52171-900, Recife, PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- Thirteen isatin derivatives with different functional groups electrochemical behaviour
- Isatin-substituted derivatives oxidation
- Isatin -substituted derivatives reduction
- Isatin derivatives redox mechanism, oxidation at the benzene ring, and reduction at the carbonyl C3-position