



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE RICINA EM MAMONA USANDO
CARBONO VÍTREO E DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Williame Farias Ribeiro

*João Pessoa – PB – Brasil
2012*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE RICINA EM MAMONA USANDO CARBONO
VÍTREO E DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Williame Farias Ribeiro *

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

SAPIENTIA AEDIFICAT

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento

*** Bolsista CAPES**

*João Pessoa – PB – Brasil
2012*

R484d Ribeiro, Williane Farias

Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro / Williane Farias Ribeiro.-- João Pessoa, 2012.

112f. : il.

Orientador: Mário César Ugulino de Araújo

Co-orientador: Valberes Bernardo do Nascimento

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Química. 2. Mamona. 3. Ricina. 4. Carbono vítreo.
5. Voltametria.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE RICINA EM MAMONA USANDO
CARBONO VÍTREO E DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Aprovada pela banca examinadora:

Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente/UFPB

Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento
2º Orientador/ UFRPE

Prof. Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda
Examinador externo/UNIT

Prof. Dr. Everaldo Paulo de Medeiros
Examinador externo/EMBRAPA Algodão

Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinador interno

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador interno

João Pessoa, 23 de março de 2012.

EPÍGRAFE

“Ser químico é pesquisar, é dedicar-se, é buscar novas tecnologias, é ter o desafio de aprimorar o que já é sabido e procurar inovar, ...”

(Luciana Magalhães/2009)

DEDICATÓRIA

À Luciana, esposa querida, cuja vida tem sido um dos versos de Vinícius: “De tudo, ao meu amor serei atento”, sua força sobre-humana, paciência e determinação para conciliar as funções de esposa, Arquiteta e Química, foram de fundamental importância para que hoje eu possa estar sendo merecedor de mais uma conquista. A você,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- ✦ A **DEUS**, ser supremo, sem o qual não teria alcançado este degrau na minha vida. Grato por a cada dia está ao meu lado me capacitando e guiando rumo ao sucesso e a realização profissional.
- ✦ A **Minha Família**, que direta ou indiretamente participou de cada etapa desta conquista. Dos quais destaco meus pais (Lenildo e Marilene), irmãos (Raissa, Wagner e Wellington), avôs e avós (Laurindo – *in memoriam*, Manoel, Maria das Dores e Doraci), tios, primos, esposa (Luciana Magalhães) e sogro e sogra (Magalhães e Lúcia).
- ✦ Ao Prof. **Dr. Mário César Ugulino de Araújo** (UFPB), pela orientação neste trabalho, amizade e compreensão. Além disso, cedeu gentilmente às instalações e equipamentos do laboratório de pesquisa – LAQA/UFPB– para que fosse possível a execução experimental deste trabalho.
- ✦ Ao Prof. **Dr. Valberes Bernardo do Nascimento** (UFRPE), pela co-orientação dispensada neste trabalho, amizade e companheirismo, mesmo à distância, superou as minhas expectativas. Ademais sou grato à disponibilidade das instalações da UFRPE, por meio do laboratório de pesquisa LAQIS.
- ✦ Ao Prof. **Dr. Everaldo Paulo de Medeiros** (EMBRAPA Algodão), que gentilmente cedeu às instalações e infraestrutura da EMBRAPA Algodão para que fosse possível a extração e aquisição da Ricina. Em adição agradeço o apoio do graduando e estagiário **Gustavo** (EMBRAPA Algodão) durante a etapa de extração e aos que demandaram tempo para ajudar nas demais etapas: **Betânia Hermenegildo** (doutoranda UFPB) e **Adenilton Camilo** (mestrando UFPB).
- ✦ A Profa. **Dra. M^a do Socorro Leite Brito** (UFPB), por ter me apresentado esta área de estudos a qual desenvolvi minha dissertação de Mestrado e a cada dia busco motivação para desenvolver novos estudos.
- ✦ Ao mestrando **Daniel Jackson** (UFPB) e a graduanda **Anabel Lourenço** (UFPB), pelo apoio dispensado na execução experimental e pesquisa bibliográfica deste trabalho.
- ✦ A **Dra. Ilanna Campelo Lopes** (COIMBRA-PORTUGAL), pela colaboração empenhada durante a elaboração desta tese.
- ✦ Ao PHD **Severino Carlos Oliveira** (COIMBRA-PORTUGAL), pelas valiosas contribuições durante as discussões deste trabalho.

- ✦ Ao doutorando **Teodor Adrian Enache** (COIMBRA-PORTUGAL), pelas valiosas contribuições durante as discussões deste trabalho.
- ✦ A Profa. Dra. **Neidenêi Gomes Ferreira** (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos–SP) pela concessão de placas de diamante dopadas com boro para os estudos iniciais.
- ✦ Ao Prof. Dr. **Giancarlo Richard Salazar Banda** (Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju–SE) por ter cedido gentilmente o eletrodo de diamante dopado com boro para execução da parte eletroanalítica desta tese. Em adição é louvável a sua gentileza na discussão e detalhes relacionados ao funcionamento do DDB.
- ✦ Aos professores **Dr. Sherlan Guimarães Lemos** (UFPB) e a **Dra. Kátia Messias Bichinho** (UFPB), pelas valiosas contribuições na pré-banca de doutoramento e banca final.
- ✦ Aos professores **Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda** (UNIT) e o **Dr. Everaldo Paulo de Medeiros** (EMBRAPA Algodão), pelas valiosas contribuições na banca final de doutoramento.
- ✦ **Aos Amigos “LAQueAnos”**, em especial, o(a)s doutorando(a)s Edilene, Wellington Lyra, Adriano, Paulo Henrique, o(a)s graduando(a)s Flaviana, Ismael, Raissa, Neto e **aos professores**, Pablo Nogueira e Edvan Cirino pela colaboração nas discussões durante os estudos.
- ✦ Aos companheiros Amazonenses: **prof. Dr. Valdomiro Lacerda** (UFAM) e Josenita, pela amizade sincera.
- ✦ **Aos Amigos do LAQIS** (UFRPE), em especial, **Prof. Msc. Thiago Selva** (IFPE), **Raphael Fonseca**, **Elaine Coelho** (UFPE) e **Ricardo**, pela colaboração nas discussões durante os estudos.
- ✦ Ao **REUNI** e a **CAPES** pela bolsa concedida.
- ✦ Ao **CNPq** pela aprovação do projeto Universal processo Nº 475879/2009-0.
- ✦ Aos amigos que estiveram presente e torceram pela realização deste trabalho: **Inalda Pontes, João Chianca, Vera Filha, Mara Simões, Rita Porto, Socorro Queiroga etc.**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Geral	4
1.1.2 Específicos	4
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1 Proteínas: considerações gerais	6
2.1.1 Aminoácidos	7
2.1.2 Caracterização e identificação das proteínas.....	10
2.1.3 Estrutura das proteínas.....	11
2.2 Lectinas.....	13
2.2.1 Mamona.....	14
2.2.1.1 Ricina: considerações gerais	16
2.2.1.1.1 Eletroquímica dos aminoácidos da RCA 60	21
2.3 Métodos analíticos aplicados à análise da RCA 60.....	26
2.4 Técnicas eletroquímicas.....	30
2.4.1 Voltametria cíclica.....	31
2.4.2 Técnicas voltamétricas de pulso	33
2.4.2.1 Voltametria de pulso diferencial	34
2.4.2.1 Voltametria de onda quadrada.....	35
2.4.3 Voltametria de Redissolução (Stripping Voltammetry)	37
2.5 Eletrodos de trabalho: carbono vítreo e diamante dopado com boro	39
3 EXPERIMENTAL	46
3.1 Instrumentação	46
3.2 Soluções e reagentes.....	47
3.3 Extração da RCA 60.....	48
3.4 Pré-tratamento dos eletrodos de trabalho	50
3.5 Testes de adsorção da RCA 60 no eletrodo de trabalho	51
3.6 Procedimentos experimentais	51

3.6.1 Investigações eletroquímicas	51
3.6.2 Método voltamétrico para determinação de RCA 60.....	52
3.6.2.1 Voltametria de onda quadrada.....	52
3.7 Variáveis de desempenho analítico.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Comportamento eletroquímico da RCA 60 em diferentes eletrodos de trabalho ...	56
4.2 Comportamento eletroquímico da RCA 60.....	57
4.2.1 Voltametria cíclica.....	57
4.2.2 Voltametria de pulso diferencial	62
4.2.3 Voltametria de onda quadrada.....	64
4.2.4 Sítios eletroativos da RCA 60	68
4.2.5 Comportamento eletroquímico da RCA 60 extraída de diferentes cultivares de mamoneira.....	69
4.3 Determinação voltamétrica da RCA 60 sobre CV.....	70
4.3.1 Comparação do perfil voltamétrico da RCA 60 com a RCA-A 30.....	70
4.3.2 Regeneração da superfície do eletrodo de trabalho	72
4.4 Determinação voltamétrica da RCA-A 30 sobre DDB	75
4.4.1 Polarização do eletrodo de DDB	75
4.4.2 Oxidação eletroquímica da RCA-A 30 sobre DDB	77
4.4.3 Influência do pH sobre a resposta voltamétrica da RCA-A 30	83
4.4.4 Estudo de pré-concentração	84
4.4.5 Otimização dos parâmetros instrumentais voltamétricos	85
4.4.6 Curva analítica.....	87
4.4.6.1 Variáveis de desempenho analítico	89
5 CONCLUSÕES	93
5.1 Propostas Futuras.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1**– Projeções de Fischer. A) Hidrólise do polipeptídeo em meio ácido formando resíduos de aminoácidos. B) Condensação de aminoácidos formando uma ligação peptídica. 7
- Figura 2.2**– Estrutura geral de um α -AA. Os grupos R diferenciam os AA-comuns.. 7
- Figura 2.3**– Estrutura dos 20 L - α -AA comuns. E= essencial; NE= não essencial; CLA= cadeias laterais apolares; CLN= cadeias laterais neutras e CLC= cadeias laterais carregadas (Adaptado de FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006; VOET, VOET e PRATT, 2000)..... 9
- Figura 2.4**– Estrutura primária. Sequência de AA em uma cadeia polipeptídica. ...11
- Figura 2.5**– (A) Estrutura secundária helicoidal α -hélice das proteínas, à esquerda. (B) Vista superior da estrutura secundária de folhas β paralelas das proteínas, à direita (Fonte: FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).....12
- Figura 2.6**– Níveis estruturais proteicos para a molécula de hemoglobina (adaptado de FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).....13
- Figura 2.7**– Estrutura 3D da RCA 60 obtida por cristalografia de raios X (ALEXANDER *et al.*, 2008). Cadeia A - enzimática (em branco, amarelo e rosa), cadeia B - lectina galactose (em verde) e ponte dissulfeto (em azul) (Adaptado de BRADBERRY, 2007).17
- Figura 2.8**– Mecanismo de ação da ricina (Fonte: AUDI *et al.*, 2007 citado e adaptado por OLIVEIRA, 2010).18
- Figura 2.9**– Formação de uma ponte dissulfeto entre duas cadeias laterais de cisteína.23
- Figura 2.10**– (i) Sinal de excitação para VC e voltamogramas cíclicos esquemáticos para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv) (adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).32
- Figura 2.11**– Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (Fonte: SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).....34

Figura 2.12– (A) Sinal de excitação para VPD e (B) Resposta típica (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).	34
Figura 2.13– (i) Sinal de excitação para VOQ e Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (ii) e de um sistema irreversível (iii) (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).....	36
Figura 2.14– Etapas envolvidas no stripping anódico (A) e catódico (B).	38
Figura 3.1– A) Potenciostato Eco Chemie, à esquerda, e o módulo polarográfico à direita. B) Célula eletroquímica e disposição dos eletrodos.	46
Figura 3.2– Eletrodo de DDB: (1) filme de DDB; (2) contato elétrico (liga estanho/chumbo); (3) isolamento do contato elétrico com resina epóxi Araldite® e (4) placa de cobre.	47
Figura 3.3– Esquema ilustrativo do processo de extração de RCA 60 a partir de diferentes cultivares de mamoneira (Fonte: acervo pessoal, 2010).	49
Figura 3.4– Esquema ilustrativo para o procedimento de recuperação baseado no método de adição de padrão.....	54
Figura 4.1– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ registrados em diferentes eletrodos de trabalho em solução tampão fosfato (pH 7,0): (—) CV; (—) EAu; (—) EPC e (—) EPt . $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$	56
Figura 4.2– Voltamogramas cíclicos de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) na ausência e (—) presença de RCA 60. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	58
Figura 4.3– Voltamogramas cíclicos de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	59
Figura 4.4– Voltamogramas cíclicos de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV em diferentes velocidades de varredura. A) (—) 10, (—) 25; (—) 50; (—) 75 e (—) 150 mV s^{-1} . B) Relação do I_p com a $\nu^{1/2}$: (●) P_1 , (○) P_2 . C) Relação do $\log I_p$ com o $\log \nu$: (●) P_1 , (○) P_2	60

Figura 4.5– Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da A) 1ª e B) 2ª varredura sobre CV obtidos em solução de RCA 60 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos em função do pH. C) Relação do E_p com o pH na 1ª varredura: (●) P_1 , (○) P_2 , (■) P_3 e (□) P_4 – 2ª varredura. D) Relação da I_p com o pH na 1ª varredura: (●) P_1 e (○) P_2 . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. 62

Figura 4.6– Voltamogramas de onda quadrada sobre o eletrodo CV de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 nas soluções tampão fosfato e tetraborato. A) pH 7,0 (1ª varredura): (—) corrente total (I_t), (—) corrente direta (I_d) e (—) corrente reversa (I_r). B) pH 7,0 (2ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . C) pH 9,0 (1ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . D) pH 9,0 (2ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$65

Figura 4.7– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida sobre CV obtidos em solução de RCA $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão borato pH 9,0: (A) 1ª (—) e 2ª (—) varredura fechando a janela de potencial em 0,5 V e (B) 1ª (—) e 2ª (—) varredura abrindo a janela de potencial até 0,9 V. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$66

Figura 4.8– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida correspondentes ao efeito de adsorção da RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CV. A) pH 7,0: (—) medida convencional e (—) adsorção livre por 10 minutos. B) Medida convencional em pH 9,0 (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª, (—) 2ª varreduras após transferência do eletrodo a solução tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$67

Figura 4.9– Esboço ilustrativo do provável mecanismo de reação para a oxidação eletroquímica da RCA 60 em pH 7,0.69

Figura 4.10– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) RCA 60 BRS Paraguaçu ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (—) RCA 60 BRS Nordeste ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (—) RCA 60 BRS Energia ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$70

Figura 4.11– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em CV e tampão fosfato (pH 7,0). A) (...) RCA 60 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste); (—) RCA 60 $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste) e (—) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ (RCA-A 30). B) Destaque para a região 0,2 a 0,9 V: (—) RCA 60 $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste) e (—) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ (RCA-A 30). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$71

Figura 4.12– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em CV e tampão fosfato (pH 7,0) de uma solução $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em diferentes

surfactantes: (—) sem surfactante, (—) DSS 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (—) BCTA 7,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) triton X-100 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$73

Figura 4.13– A) Voltamogramas cíclicos para o sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1,0 mmol L^{-1}) em ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} (pH 1,0) sobre DDB (8.000 ppm de boro): (—) sem polarização, (—) polarização catódica e (—) polarização anódica. B) Relação do I_{pa} com a $\nu^{1/2}$: (●) polarização catódica, (■) polarização anódica e (▲) sem polarização.....76

Figura 4.14– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em DDB (8.000 ppm) de uma solução 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em tampão fosfato (pH 7,0). (—) DDB polarizado catodicamente e (—) DDB polarizado anodicamente. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$78

Figura 4.15– A) Relação do I_p com a $\nu^{1/2}$. Inserção: voltamogramas cíclicos de uma solução 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em tampão fosfato (pH 7,0) sobre DDB em diferentes velocidades de varredura. B) Relação do $\log I_p$ com o $\log \nu$ 79

Figura 4.16– Voltamogramas de onda quadrada sobre DDB polarizado catodicamente. A) 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} pH 7,0): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$. B) 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1} pH 1,0): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $f = 35 \text{ s}^{-1}$ e t_d (circuito aberto) = 120s.....81

Figura 4.17– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida correspondentes ao efeito de adsorção da RCA-A 30 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre DDB polarizado catodicamente em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Medida convencional em pH 1,0 (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª, (—) 2ª varreduras após transferência do eletrodo a uma solução H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} recém preparada. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$82

Figura 4.18– A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB em diferentes eletrólitos em função do pH. B) Relação do E_p e I_p com o pH: (●) E_p e (○) I_p . $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$83

Figura 4.19– Voltamogramas de onda quadrada de uma solução 0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB em diferentes tempos de pré-concentração em circuito aberto. Ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} (pH 1,0), com $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$. (—) $t_d = 0\text{s}$, (—) $t_d = 120\text{s}$ e (—) $t_d = 300\text{s}$85

Figura 4.20– Estudo da frequência de aplicação de pulso de potencial. A) Relação I vs. f . Inserção dos voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB polarizado catodicamente. B) Relação I vs. $f^{1/2}$. H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0), $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120 \text{ s}$86

Figura 4.21– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB polarizado catodicamente. A) Estudo do incremento. $f = 35 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$. B) Estudo da amplitude de pulso. $f = 35 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) e $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120 \text{ s}$87

Figura 4.22– Curva analítica e inserção de voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução da RCA-A 30 em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) sobre DDB polarizado catodicamente. $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120 \text{ s}$. [RCA-A 30]: (a) 0; (b) 3,3; (c) 17; (d) 28; (e) 45; (f) 61; (g) 94; (h) 130 e (i) 160 nmol L^{-1}88

Figura 4.23– Curva analítica para adição de padrão RCA-A 30 em amostra deslipidada de RCA 60 da cultivar BRS Paraguaçu. Inserção de voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução da RCA-A 30 em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) sobre DDB polarizado catodicamente. $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120 \text{ s}$. [RCA-A 30]: (a) amostra; (b) 3,3; (c) 6,6 e (d) $9,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição de algumas proteínas quanto aos resíduos de AA presentes em sua estrutura primária**	12
Tabela 2.2 – Resíduos de aminoácidos da RCA 60 (adaptado de CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008).	22
Tabela 2.3 – Testes diagnósticos para processos redox usando VC (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001).	33
Tabela 2.4 – Testes diagnósticos para processos redox usando VOQ (Adaptado de SOUZA; MACHADO e AVACA, 2003).....	37
Tabela 3.1 – Soluções Tampão para eletrólitos de suporte com diluição para 100 mL de água (adaptado de OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007).....	48
Tabela 4.1 – Propriedades eletroquímicas do DDB para o sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ frente ao tipo de polarização superficial.....	77
Tabela 4.2 – Comparação de valores de LD encontrados por diferentes técnicas usadas para a determinação de traços de ricina. (Adaptado de MUSSHOF e MADEA, 2009)	89
Tabela 4.3 – Resultados para o estudo de recuperação de RCA-A 30 em uma amostra de RCA 60 BRS Paraguaçu.	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
Ala	Alanina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BRS	Designa a cultivar brasileira da EMBRAPA
CLA	Cadeia lateral apolar
CLC	Cadeia lateral carregada
CLN	Cadeia lateral neutra
CV	Carbono vítreo
Cys	Cisteína
DDB	Diamante dopado com boro
DL₅₀	Dose letal
DPR	Desvio padrão relativo
E_{1/2}	Potencial de meia onda
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
E_i	Potencial inicial
ELISA	do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
E_p ou E	Potencial de pico (“a” anódico e “c” catódico)
E_λ	Potencial de inversão de varredura
f	Frequência de aplicação de pulso
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GP	Grafite pirolítico
HF-CVD	(do inglês: <i>Hot Filament Chemical Vapor Deposition</i>) - Técnica por filamento quente
His	Histidina
I_d	Corrente direta
Ile	Isoleucina
I_p ou I	Corrente de pico (“a” anódico e “c” catódico)
I_r	Corrente reversa

I_t	Corrente total ou resultante
L	Levorrotatória
LD	Limite de detecção
LEC	Lectinas
Leu	Leucina
LL	Limite de linearidade
LQ	Limite de quantificação
Lys	Lisina
Met	Metionina
PC	Pasta de carbono
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RAE	Resíduos de aminoácidos essenciais
RCA 120	<i>Ricinus Communis Agglutinin</i> (classe I)
RCA 60	<i>Ricinus Communis Agglutinin</i> (classe II, ricina)
RCA-A 30	Cadeia A da RCA 60
RCA-B 30	Cadeia B da RCA 60
S/R	Relação sinal-ruído
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
UV-VIS	Radiação ultravioleta-visível
Val	Valina
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
W_{1/2}	Largura a meia altura
ΔE_p	Amplitude de pulso
ΔE_s	Incremento de potencial
ΔE_t	Largura de pulso ou tempo de modulação
v	Velocidade de varredura

RESUMO

RIBEIRO, W. F. **Determinação Voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro.** 2012. 112 fls. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2012.

A Ricina (RCA 60) é uma proteína tóxica inibidora dos ribossomos, de classe II, extraída do endosperma da semente da mamona, constituída por duas cadeias peptídicas (RCA-A 30 e RCA-B 30) ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto, formada pela combinação dos resíduos de 17 aminoácidos essenciais. Sua toxicidade tem sido observada em animais, insetos e humanos, seja por inalação, ingestão ou injeção, tendo, por conseguinte, sido utilizada na produção de armas químicas, paradoxalmente, com aplicações medicinais. Os principais métodos analíticos para a detecção e determinação de RCA 60 empregam separações cromatográficas, biossensores e ensaios imunológicos. Por outro lado, não existem trabalhos na literatura que empregam voltametria para determinação de RCA 60. Assim, neste trabalho a oxidação eletroquímica da RCA 60 foi estudada usando um eletrodo de carbono vítreo (CV). Além disso, foi desenvolvido um método voltamétrico por voltametria de onda quadrada (VOQ) para a determinação da RCA-A 30 com pré-concentração, empregando um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). Dois principais picos de oxidação eletroquímica quase-reversíveis da RCA 60 foram verificados sobre CV por VOQ e voltametria cíclica. O estudo do pH por voltametria de pulso diferencial revelou ampla dependência ($2,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$) com os potenciais de pico de modo que o mecanismo de reação envolve a transferência de $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ e $1\text{H}^+/1\text{e}^-$, para os P_1 e P_2 , respectivamente, com surgimento de um produto de oxidação em $\text{pH} \geq 7,0$, decorrente do pico P_2 . Ambos os picos apresentaram intensidade de corrente máxima em pH 7,0. Embora tenha sido observado comportamento eletroquímico similar para amostras de RCA 60 de cultivares diferentes nesse eletrodo, a forte evidência de envenenamento superficial do eletrodo foi determinante para a escolha do DDB para desenvolvimento do método voltamétrico. Testes com o padrão analítico da cadeia A da RCA 60 (RCA-A 30), confirmam os picos P_1 e P_2 , sendo P_2 mais sensível para fins analíticos. Um comportamento irreversível para P_2 foi diagnosticado para RCA-A 30 em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 1,0), facilitado pela pré-concentração por adsorção sobre DDB. A excelente resposta voltamétrica do material pré-concentrado, permitiu o desenvolvimento de um método sensível e confiável, com uma faixa de linearidade de 3,3 a 94 nmol L^{-1} com um limite de detecção e quantificação de 19 e $62 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Recuperação de 90,9% foi verificado para $3,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de RCA-A 30 em um extrato deslipídado de RCA 60, extraído da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu, respectivamente, o que está dentro dos limites sugeridos pela AOAC. Novas aplicações do método para outras amostras de cultivares de mamoneira estão em curso.

Palavras-chave: mamona, ricina, carbono vítreo, diamante dopado com boro, voltametria.

ABSTRACT

RIBEIRO, W. F. **Voltammetric determination of ricin in castor bean using gassy carbon and boron doped diamond**. 2012. 112 fls. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2012.

Ricin (RCA 60) is an inhibitor of ribosomes protein toxic, of class II, extracted from castor bean endosperm of the seed, consisting of two peptide chains (RCA-A 30 and RCA-B 30) linked by a disulfide bridge covalently formed by the combination of 17 amino acid residues. Its toxicity has been observed in animals, insects and humans, being by inhalation, ingestion or injection, and, therefore, has been used in the production of chemical weapons, paradoxically, with medical applications. The main analytical methods for the detection and determination of RCA 60 employing chromatographic separations, biosensors and immunochemical assays. In another hand, there are no reports in the literature employing voltammetry for determining RCA 60. In this work the electrochemical oxidation of the RCA 60 was studied using a glassy carbon electrode (GC). Moreover, it has been developed a voltammetric method by square wave voltammetry (SWV) with pre-concentration over a boron-doped diamond electrode (BDD) for determination of ricin. Two main peaks of quasi-reversible electrochemical oxidation of the RCA 60 were observed on GC by SWV and cyclic voltammetry. The study of the pH by differential pulse voltammetry showed wide dependency ($2.0 \leq \text{pH} \leq 10.0$) at the peak potentials, so that the reaction mechanism involves transferring of $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ and $1\text{H}^+/1\text{e}^-$, to the P_1 and P_2 , respectively, with appearance of an oxidation product at $\text{pH} \geq 7.0$ due to peak P_2 . Both peaks showed maximum current intensity at pH 7.0. Although similar electrochemical behavior was observed for samples of RCA 60 different cultivars in this electrode, the strong evidence of poisoning of the electrode surface was decisive for the choice of BDD for the development of a voltammetric method. Tests with an analytical standard RCA 60 chain A (RCA-A 30) on GC, confirm the peaks P_1 and P_2 . P_2 is more sensitive for analytical purposes. An irreversible behavior for P_2 was observed for the RCA-A 30 in sulfuric acid (0.1 mol L^{-1} , pH 1.0), facilitated by pre-concentration by adsorption on BDD. The excellent voltammetric response of the pre-concentrate material, allowed the development of a sensitive and reliable method, with a linearity range from 3.3 to 94 nmol L^{-1} with a limit of detection and quantification of 19.0 and $62.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Recovery of 90.9% was verified for $3.3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ of RCA-A 30 spiked in a RCA 60 extracted from the castor bean cultivar BRS Paraguaçu sample, which are within the limits suggested by the AOAC. New applications of the method for other real samples are in progress.

Keywords: castor bean, ricin, glass carbon, boron doped diamond, voltammetry.



INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1



1 INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham funções extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores e transportadores através das membranas celulares (ZAIA, ZAIA e LICHTIG, 1998). Além disso, independentemente de sua função ou espécie de origem, elas são construídas a partir de um conjunto básico de vinte aminoácidos comuns (sintetizados pelo DNA humano) e alguns especiais, arranjados em várias sequências específicas, que compõem a cadeia de aminoácidos (CAMPOS, 2002; VOET, VOET e PRATT, 2000).

A presença de substâncias tóxicas nas sementes de certas plantas foi reconhecida desde 1888. Neste universo se incluem as lectinas de elevado poder de toxicidade, como a difteria, pseudomonas e toxina do antraz, que compõem as toxinas da família A-B (OLSNES e KOZLOV, 2001). Além dessas, destaca-se a ricina, fração proteica da semente de mamona, de alta toxicidade capaz de aglutinar células vermelhas sanguíneas (LORD, ROBERTS e ROBERTUS, 1994), extraída especialmente do endosperma da semente da mamona, planta cultivada nas regiões temperadas e tropicais do mundo, por seu óleo ser extensivamente usado para fins medicinais e industriais (ANANDAN *et al.*, 2005). A torta, co-produto gerado da extração do óleo de mamona pode ser usado como ração animal por ser rico em nutrientes, sobretudo proteínas. Entretanto, compostos alergênicos e de alta toxicidade, no caso a ricina, são gerados nesse processamento, impedindo o seu uso promissor como ração animal (ANANDAN *et al.*, 2005).

A ricina é uma fitoproteína de elevada toxicidade encontrada na natureza (ANANDAN *et al.*, 2005). Ela é uma glicoproteína de alto peso molecular, de estrutura não conhecida, constituída por duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por uma ponte dissulfeto, constituindo as proteínas inativadoras dos ribossomos (ANANDAN *et al.*, 2005; OLSNES e KOZLOV, 2001). Devido aos efeitos extremos, esta tem sido usada como arma química e paradoxalmente em fins medicinais (CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008). Diversos acidentes envolvendo ricina já foram relatados na literatura, principalmente por ingestão de alimentos e água contaminados com essa substância, por ser uma substância solúvel em água. A



carência de métodos sensíveis e rápidos impõe o desenvolvimento de novas metodologias para o controle dessa toxina, em alternativa aos métodos imunológicos, cromatográficos e eletroforéticos, comumente usados. Os métodos eletroquímicos são promissores para determinações em baixas concentrações, em matrizes complexas (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Poucos relatos são encontrados na literatura empregando métodos eletroquímicos para proteínas, o que é o foco do presente trabalho. Nesse cenário diversos eletrodos podem ser empregados: eletrodos a base de carbono, eletrodos metálicos e em especial eletrodos quimicamente modificados, cujo objetivo da modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como forma de alterar a reatividade e seletividade de sensores, com fins aplicativos a oxidação de biomoléculas como proteínas, enzimas, neurotransmissores, aminoácidos, vitaminas, DNA, NADH, entre outros. (SOUZA, 1997; PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002; USLU e OZKAN, 2007). Neste contexto, a literatura apresenta o uso de nanotubos de carbono (funcionalizados ou não) para modificação de eletrodos, uma vez que estes possuem características mecânicas e estruturais próprias à mediação de reações de transferência eletrônica direta entre proteínas e eletrodos (ACOBS, PEAIRS e VENTON, 2010; HIRLEKAR *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011). Ainda, em se tratando de eletrodos, recentemente os eletrodos de diamante dopado com boro (DDB) são mais uma alternativa dentre os eletrodos sólidos, por apresentar algumas características que lhes são peculiares, como ampla janela de potencial, baixas correntes de fundo, excelente resistência à passivação e baixa adsorção de moléculas polares (MEDEIROS *et al.*, 2008; PEDROSA, CODOGNOTO e AVACA, 2003).

Este trabalho é voltado para o estudo da oxidação eletroquímica da ricina e desenvolvimento de um método voltamétrico para análise em baixas concentrações desta proteína.



1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Determinar ricina extraída da mamona usando eletrodos de carbono vítreo e diamante dopado com boro empregando técnicas voltamétricas.

1.1.2 Específicos

- ✦ Escolher o eletrodo de trabalho adequado à determinação de ricina;
- ✦ Investigar propriedades eletroquímicas da ricina sobre eletrodo de CV e DDB, utilizando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada (VOQ);
- ✦ Identificar a origem dos possíveis sítios eletroativos da ricina com base na literatura;
- ✦ Otimizar a etapa de limpeza do eletrodo de trabalho, visando sua regeneração;
- ✦ Estabelecer condições experimentais e variáveis instrumentais da técnica VOQ para o desenvolvimento de um método analítico para determinação de ricina;
- ✦ Determinar os limites de detecção e quantificação da metodologia proposta;
- ✦ Determinar o nível de recuperação da ricina em amostras extraídas de diferentes cultivares de mamoneira.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO 2



2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo será apresentado um breve levantamento bibliográfico visando reunir informações relevantes para subsidiar o presente trabalho. A luz dessa discussão será apresentada a definição, classificação, características estruturais e os métodos empregados para purificação de proteínas e aminoácidos. Além disso, discorrer sobre a ricina, objeto de estudo desta tese, e de forma sucinta apresentar, o panorama das técnicas voltamétricas e a sua aplicação para eletroanálise, com vista ao desenvolvimento de métodos voltamétricos aliados à determinação de aminoácidos. Posteriormente, no contexto desse trabalho, situar o uso de diversos eletrodos empregados para o desenvolvimento de metodologias eletroquímicas.

2.1 Proteínas: considerações gerais

O termo proteína (do grego, *proteios*, que significa “em primeiro lugar” - devido a sua importância para a vida) foi atribuído pelo químico holandês G. J. Mulder em 1839. As proteínas são polímeros de estrutura complexa (massa molecular de 15.000 a 20.000.000 ou mais unidades de massa atômica), sintetizadas pelos organismos vivos por meio da condensação de muitos α -aminoácidos, através de ligações peptídicas ou amídicas, que resultam da ligação entre o grupo ácido carboxílico de um dos aminoácidos e o grupo amina do outro aminoácido, **Figura 2.1A**. As possíveis combinações de aminoácidos para a formação de proteínas são praticamente infinitas. Por outro lado, a hidrólise das ligações peptídicas das diversas formas proteicas em meio ácido, conduz à formação de um conjunto constituído por aproximadamente 25 α -aminoácidos diferentes, **Figura 2.1B** (CAMPOS, 2002; VOET, VOET e PRATT, 2000; WEIL, 2000).

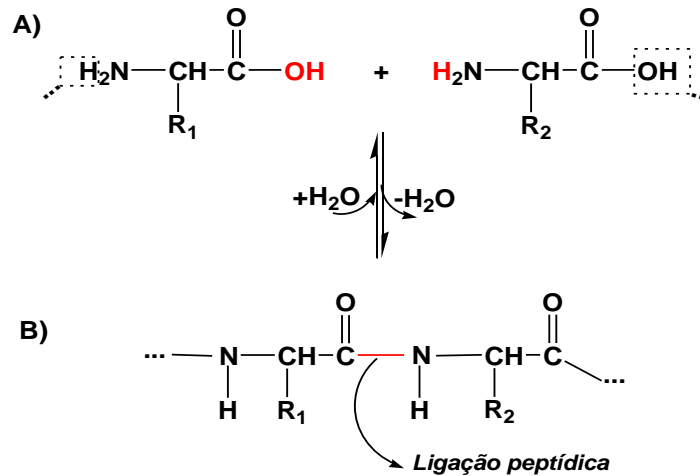


Figura 2.1– Projeções de Fischer. A) Hidrólise do polipeptídio em meio ácido formando resíduos de aminoácidos. B) Condensação de aminoácidos formando uma ligação peptídica.

2.1.1 Aminoácidos

Os aminoácidos (AA) são as unidades fundamentais dos peptídeos e das proteínas, por isso apresentam em sua constituição química os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e também enxofre, a exemplo da cisteína e da metionina. Os AA comuns (padrões ou primários), também conhecidos como α -AA, apresentam uma estrutura geral, **Figura 2.2**, constituída por um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$), ambos substituintes do mesmo carbono α (em relação ao grupo carboxila). Este, além de fazer ligação com um átomo de hidrogênio, liga-se a uma cadeia lateral, determinando a identidade de um AA específico. A única exceção é a prolina, que possui um grupo amino secundário, $-\text{NH}-$, (VOET, VOET e PRATT, 2000).

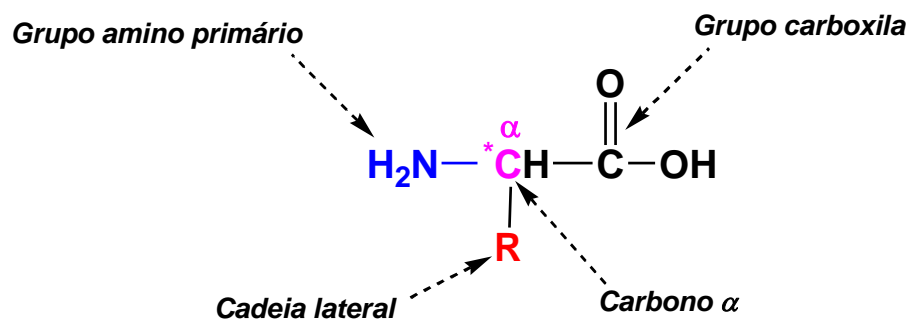


Figura 2.2– Estrutura geral de um α -AA. Os grupos R diferenciam os AA-comuns.



Os α -AA, exceto a glicina, apresentam centros assimétricos ou quirais, **Figura 2.2**. Logo, apresentam atividade óptica, isto é, desviam o plano da luz polarizada, aparecendo quase sempre na forma estereoquímica *L* (levorrotatória, rotação da luz polarizada para a esquerda). Isso reforça que todos os AA derivados de proteínas apresentam configuração estereoquímica *L*, logo, possuem a mesma configuração relativa em torno de seus átomos C_{α} (VOET e VOET e PRATT, 2000).

Em um AA coexistem ambas as espécies, ácido e base, estando os grupos amino e carboxílico na forma ionizada. Uma vez que ácidos e bases neutralizam-se formando sal, em um AA ocorrerá uma neutralização intramolecular, formando um sal interno que na verdade é um íon dipolar denominado *zwitterion*, podendo ser neutro (mesmo número de grupos carboxila e amina), positivo (número de grupos amina superior a carboxila) ou negativo (número de grupos carboxila superior a amina). Desse modo, em pH fisiológico, os grupos amino são protonados e os grupos carboxílicos assumem a forma desprotonada (base conjugada). Em adição, os grupos α -carboxílicos e α -amino apresentam valores típicos de pKa ao redor de 2,2 e 9,4, respectivamente (VOET, VOET e PRATT, 2000).

Os α -AA apresentam as seguintes características físicas: são sólidos incolores, em sua maioria apresentam sabor adocicado, alguns insípidos e outros amargos, apresentam solubilidade variável, exceto a glicina que é bastante solúvel em água.

Existem cerca de 300 tipos de AA que funcionam como sistema tampão, controlando o pH das células. Apenas 20 podem ser sintetizados pelo DNA humano, sendo caracterizados como AA comuns (**Figura 2.3**). Desses, nove são ditos essenciais ou indispensáveis e os demais são considerados não essenciais ou dispensáveis (VOET, VOET e PRATT, 2000).

Os AA essenciais são aqueles que o organismo humano precisa para o seu metabolismo e que pode ou não sintetizá-los. Desse modo, devem ser ingeridos através de alimentos para evitar sua deficiência no organismo. Assim, a alimentação deve ser a mais variada possível para que o organismo se satisfaça com o maior número de AA. São eles: leucina, valina, histidina, isoleucina, lisina, triptofano, fenilalanina, metionina e treonina, sendo encontrados principalmente em vegetais, hortaliças, legumes, carne, leite e ovos. Em contra partida, os AA não essenciais são



aqueles que o organismo humano é capaz de sintetizar a partir de outros aminoácidos. São eles: glicina, alanina, serina, cisteína, tirosina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina e prolina (VOET, VOET e PRATT, 2000).

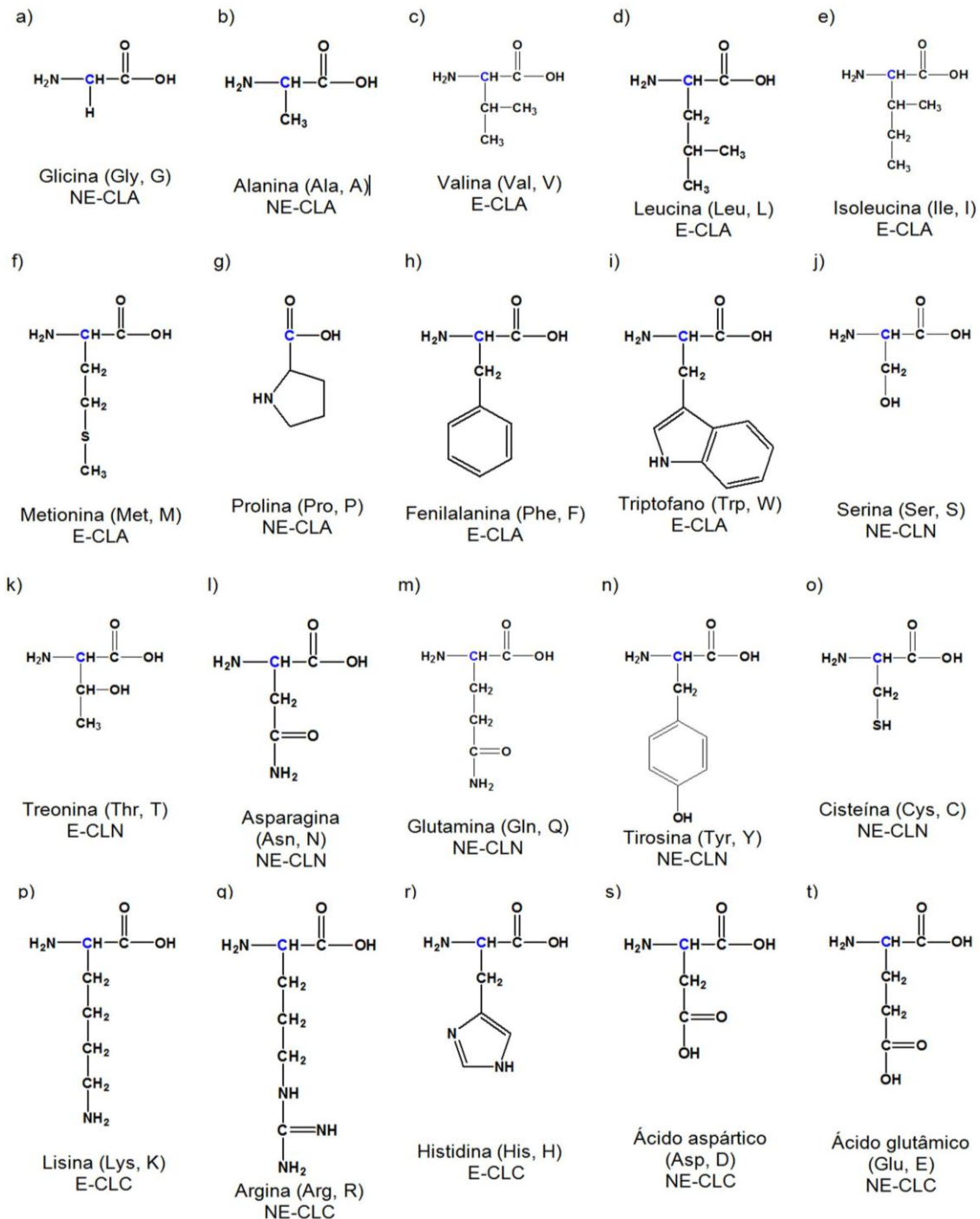


Figura 2.3– Estrutura dos 20 L - α -AA comuns. E= essencial; NE= não essencial; CLA= cadeias laterais apolares; CLN= cadeias laterais neutras e CLC= cadeias laterais carregadas (Adaptado de FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006; VOET, VOET e PRATT, 2000).



2.1.2 Caracterização e identificação das proteínas

A purificação é um passo fundamental no estudo de macromoléculas. Assim, do ponto de vista prático, o primeiro passo para isolar uma proteína ou outra molécula biológica, consiste em removê-la da célula e colocá-la em solução. Diante disso, alguns cuidados devem ser tomados, pois, uma vez removida do seu ambiente natural, esta fica à margem da ação de fatores externos que podem prejudicar o processo de purificação (VOET, VOET e PRATT, 2000). Dentre esses fatores, merecem atenção especial: pH (desnaturação, ou seja, a deformação estrutural da proteína e até mesmo a degradação química), temperatura (desnaturação a temperaturas altas) e ação de enzimas degradativas (nucleases e proteases inibidas mediante ajuste do pH e temperatura). Quando nos referimos a métodos de purificação de proteínas estamos diretamente pensando em meios adequados para sua detecção. Aliado a esse processo, alguns métodos clássicos são apresentados na literatura (VOET, VOET e PRATT, 2000):

- reação catalisada pela ação enzimática;
- imunoquímicos: imunoensaios são conduzidos usando anticorpos (proteínas produzidas pelo sistema imunológico dos animais em resposta a introdução de corpos estranhos – antígeno). Destacamos aqui as técnicas de radioimunoensaio e de imunoensaio enzimático (ELISA);
- separações cromatográficas: procedimentos de fracionamento que levam em consideração as propriedades das proteínas (solubilidade, carga iônica, volume hidrodinâmico, tamanho molecular e capacidade de ligação com outras biomoléculas). Referenciamos aqui a cromatografia de troca iônica, eletroforese, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de permeação em gel, ultracentrifugação e cromatografia por afinidade;
- Separações eletroforéticas: separação das proteínas pelo seu tamanho e outras propriedades físico-químicas, através do fluxo em um tubo capilar.



2.1.3 Estrutura das proteínas

Como não existe um sistema universal de classificação para as proteínas, a literatura reporta que podem ser classificadas quanto à composição, solubilidade, estrutura, forma e função. Desse modo, dependendo do tipo de AA que possui, do tamanho da cadeia e da configuração espacial da cadeia polipeptídica, quanto à estrutura, as proteínas podem apresentar-se nas formas primária e tridimensional ou estereoquímica, na qual estão incluídas as estruturas secundária, terciária e quaternária, mantidas por diferentes formas de ligação, seja linear (estrutura primária) ou por meio de ligações iônicas, interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio (estruturas secundárias e terciárias). A cristalografia dessas estruturas tem sido avaliada por difração de raios-X ou por estudos de ressonância magnética nuclear, RMN (CAMPOS, 2002; VOET; VOET; PRATT, 2000; WEIL, 2000).

A estrutura primária de uma proteína, **Figura 2.4**, consiste na sequência de AA da(s) sua(s) cadeia(s) polipeptídica(s). Essas estruturas resultam em uma longa cadeia de AA, com uma extremidade aminoterminal (N-terminal) e outra carbóxi-terminal (C-terminal), onde as ligações peptídicas e pontes dissulfeto (no caso de moléculas de cisteína, —S—S—) são estabelecidas sem considerar a orientação espacial da molécula (CAMPOS, 2002; FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006; VOET, VOET e PRATT, 2000).



Figura 2.4– Estrutura primária. Sequência de AA em uma cadeia polipeptídica.

Na **Tabela 2.1** está apresentada a composição de algumas proteínas quanto aos resíduos de AA presentes em sua estrutura primária. Os resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica estão condicionados à existência de 20 L - α -AA comuns. Logo, para uma proteína de n resíduos, existem 20^n possíveis sequências de AA na composição da cadeia polipeptídica (VOET, VOET e PRATT, 2000).



Tabela 2.1– Composição de algumas proteínas quanto aos resíduos de AA presentes em sua estrutura primária^{*,**}.

Proteína	Resíduos de aminoácidos	Subunidades	Massa Molecular (D)
Inibidor de proteinase III (melão)	30	1	3.409
Citocromo c (humano)	104	1	13.000
Ribonuclease H (<i>E. Coli</i>)	155	1	17.600
Interferon- γ (coelho)	288	2	34.200
Corismato-mutase (<i>Bacillus subtilis</i>)	381	3	43.500
Triose-fosfato-isomerase (<i>E. Coli</i>)	510	2	56.400
Ricina* (endosperma da semente da mamona)	516	2	≈ 60.000
Hemoglobina (humana)	574	4	64.500
RNA-polimerase (bacteriófago T7)	883	1	98.000
Nucleosídeo-difosfato-cinase (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	930	6	102.000
Piruvato-descarboxilase (levedura)	2.252	4	250.000
Glutamina-sintetase (<i>E. Coli</i>)	5.616	12	600.000
Titina (humana)	26.926	1	2.990.000

Fonte: adaptado de (*CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008; **VOET, VOET e PRATT, 2000).

O termo estrutura secundária refere-se à conformação local de alguma porção de um polipeptídeo, ou seja, é o arranjo tridimensional de AA localizados mais próximos dentro da estrutura primária. Ocorre devido à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos alfa dos AA e os seus grupamentos amina e carboxila, **Figura 2.5.**

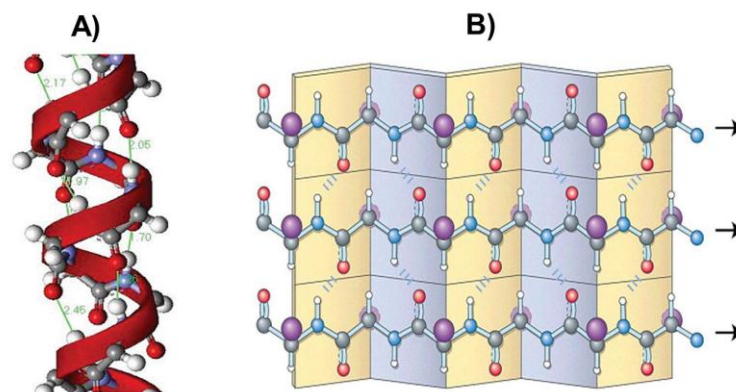


Figura 2.5– (A) Estrutura secundária helicoidal α -hélice das proteínas¹, à esquerda. (B) Vista superior da estrutura secundária de folhas β paralelas das proteínas², à direita (Fonte: FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).

¹ Destaque para a hélice orientada à direita e para as ligações de hidrogênio intracadeia.

² As cadeias são estendidas lado a lado para formar estruturas semelhantes a pregas. Esse arranjo é estabilizado por ligações de hidrogênio entre segmentos adjacentes da cadeia. Nas folhas β paralelas, a orientação aminoterminal e carboxiterminal das cadeias é a mesma.



As estruturas secundárias mais comuns são originadas pelas rotações em torno das ligações adjacentes à ligação peptídica e são conhecidas como α -hélices e folhas β , **Figura 2.5** (VOET, VOET e PRATT, 2000; CAMPOS, 2002; FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).

A estrutura terciária das proteínas inclui interações de AA bem mais distantes na cadeia primária. Isso implica que a proteína possui maior grau de enrolamento, gerando as pontes dissulfeto que estabilizam esses enrolamentos. Além disso, corresponde à conformação tridimensional das cadeias polipeptídicas e é fundamental para a atividade biológica (CAMPOS, 2002; FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006; VOET, VOET e PRATT, 2000).

A estrutura quaternária corresponde ao nível superior de complexidade na estrutura das proteínas e ocorre quando quatro cadeias polipeptídicas são associadas mediante ligações de hidrogênio, como ocorre na formação da molécula de hemoglobina. Além disso, correspondem a associações entre várias cadeias polipeptídicas que se mantêm unidas por forças covalentes, como pontes dissulfeto, e ligações não covalentes, como as pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas entre outras (CAMPOS, 2002; FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006; VOET, VOET e PRATT, 2000).

De forma ilustrativa, na **Figura 2.6**, estão apresentados os níveis estruturais proteicos para a molécula de hemoglobina.

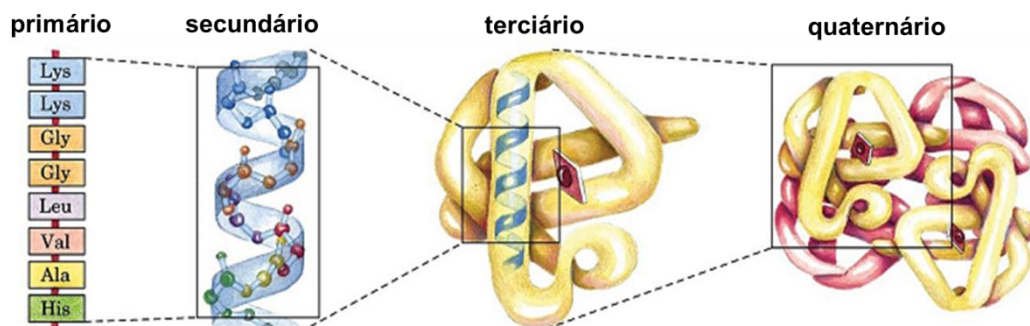


Figura 2.6– Níveis estruturais proteicos para a molécula de hemoglobina (adaptado de FRANCISCO Jr. e FRANCISCO, 2006).

2.2 Lectinas

As lectinas (LEC) consistem em proteínas não imunológicas presentes na maioria de todas as formas de vida que possuem sítios ativos capazes de ligar-se a



diversos tipos de carboidratos de membranas celulares ou substâncias que contenham açúcares (grupo prostético), como glicoproteínas (BUTERA *et al.*, 2007; SILVA e SILVA, 2000). Largamente distribuídas na natureza, podem ser isoladas a partir de seres unicelulares (IMBERT *et al.*, 2004), animais (MOURA *et al.*, 2006) e vegetais (LEITE *et al.*, 2005) e estão envolvidas em numerosos processos celulares. Sendo amplamente distribuídas no reino vegetal, estão inseridas nas categorias de proteínas que apresentam capacidade relacionada à inativação dos ribossomos, podendo ser do tipo I e II. Embora as proteínas do tipo I tenham sua síntese interrompida em consequência da inativação dos ribossomos, não apresentam atividade citotóxica, visto que não há meios de penetrar na célula eucariótica para obtenção de substrato ribossomal. Por outro, as do tipo II são altamente citotóxicas, com capacidade de atuar nos ribossomos e causar a morte celular (LORD, ROBERTS e ROBERTUS, 1994; OLSNES e KOZLOV, 2001).

A estabilidade térmica das LEC é bastante variável (POVINELI e FINARDI FILHO, 2002), mas mostram-se estáveis se mantidas congeladas por meses ou anos, após sucessivos congelamentos e descongelamentos (CORREIA e COELHO, 1995) ou mantidas por poucos dias em temperatura ambiente (RAY *et al.*, 1992).

De acordo com Ratanapo, Ngamjunyaporn e Chulavatnatol (2001), as LEC vegetais são encontradas em raízes, frutos, flores, cascas, folhas e sementes. Dentre as famílias dessas LEC, referenciam-se as famílias *Leguminosae*, *Solanaceae* e *Euphorbiaceae* (WITITSUWANNAKUL, WITITSUWANNAKUL e SAKULBORIRUG, 1998). No grupo destas últimas encontra-se a mamona em que as LEC isoladas concentram-se em maior proporção nas suas sementes (BUTERA *et al.*, 2007).

2.2.1 Mamona

A mamona ou mamoneira (*Ricinus communis*), planta perene nativa de regiões tropicais e subtropicais do mundo (ENDO *et al.* (1987)³ citados por BARNES, BALDWIN e BRAASCH (2009); HOFFMAN *et al.*, 2007), é uma das 7.000 espécies

³ ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.*, 262, 1987, 5908.



da família das Euforbiáceas, originária da Etiópia, no Continente Africano sendo conhecida popularmente como carrapateira, rícino e palma-de-cristo. Na sua cadeia produtiva, o óleo é o principal produto comercial e a torta é o co-produto de baixo valor de mercado.

O óleo extraído de suas sementes (sem casca), em geral, possui 90% de ácido ricinoléico, o qual lhe confere propriedades interessantes como alta solubilidade em etanol e alto poder de lubricidade; constitui-se em importante fonte para produção de biodiesel e para fabricação de plásticos, fibras sintéticas, manufaturas de cosméticos, sabões, polímeros, esmaltes, corantes, desinfetantes aderentes, resinas e lubrificantes de aeronaves militares, constituindo assim, a química do óleo de mamona (ricinoquímica) (CANGEML, SANTOS e CLARO NETO, 2010; HOFFMAN *et al.*, 2007).

Por outro lado, a torta da mamona é uma massa orgânica utilizada, em geral, como adubo orgânico (alto teor de nitrogênio), controle de nematóides do solo e, ainda com uso restrito, após detoxicação, como complemento em ração animal (agregar valor comercial à mamona) devido ao elevado teor de proteína, composta pelos aminoácidos: arginina, cistina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, tirosina, treonina, triptofano e valina (BELTRÃO, 2003). Além disso, a torta é constituída por fibras, materiais minerais, lipídios totais e matéria seca.

O uso da torta de mamona como ração tem sido comprometido pela inexistência de tecnologia viável em nível industrial para seu processamento e também por apresentar em sua composição compostos tóxicos e alergênicos, a saber: ricina (proteína altamente citotóxica com fraca atividade hemaglutinante), ricinina (alcalóide relativamente inofensivo, presente nas sementes e folhas da mamona, de massa molecular $164,2 \text{ g mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2$) e os alérgenos (mistura de proteínas de baixo peso molecular e polissacarídeos) pertencentes à classe das albuminas 28S (CANGEML, SANTOS e CLARO NETO, 2010; HOFFMAN *et al.*, 2007; SEVERINO, 2005).

Processos físicos e químicos têm sido utilizados para a detoxificação e desalergenização da torta da mamona (ANANDAN *et al.*, 2005). Dentre os processos químicos estão os tratamentos com amônia, formaldeído, hidróxido de cálcio, cloreto de sódio, ácido tânico e hidróxido de sódio, em diferentes



concentrações (ANANDAN *et al.*, 2005). Por outro lado, os processos físicos mais indicados são aqueles que empregam tratamentos com imersão em água, vapor de água, ebulição, autoclavagem e aquecimento em diferentes intervalos de tempo (ANANDAN *et al.*, 2005).

Estudos desenvolvidos por Anandan *et al.*, (2005) demonstraram que os tratamentos com hidróxido de cálcio (40 g kg⁻¹) e autoclavagem (15 psi, 60 min) destroem completamente a toxina. Cangemi, Santos e Claro Neto (2010) relatam que a ricina pode ser eliminada da água através de processos de cozimento com vapor de água saturado. Isso ocorre em decorrência da sua baixa estabilidade térmica e da elevada solubilidade em água.

De forma alternativa, Freire (2001)⁴ citado por Hoffman *et al.*, (2007) afirma que o melhoramento genético (tradicional ou por transgenia) é uma maneira eficaz para eliminar a ricina da mamona. Entretanto, alerta que tal prática pode trazer problemas agrônômicos à cultura, entre eles a susceptibilidade da planta ao fungo *Fusarium* e a certas pragas comuns à cultura.

Além dos compostos supracitados, também pode ser isolada a aglutinina, conhecida como *Ricinus communis agglutinin* (de classe I, massa molecular ≈ 120 kDa - RCA 120), proteína não citotóxica de elevada atividade hemaglutinante (BUTERA *et al.*, 2007). Assim, dos compostos citados, o envenenamento por ingestão da semente da mamona é provocado pela ricina, objeto de estudo deste trabalho e não pela RCA 120 (JACKSON, TOLLESON e CHIRTE, 2006⁵ citados por HOFFMAN *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Ricina: considerações gerais

A ricina foi nomeada por Herman Stillmark, em 1888, quando testou o extrato de sementes de mamona em células vermelhas de sangue e observou que os eritrócitos se aglutinaram. Esta toxina é uma glicoproteína que constitui cerca de

⁴ FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica, 2001. Cap. 13, p. 296-335.

⁵ JACKSON, L. S.; TOLLESON, W. H.; CHIRTE, S. J. Thermal inactivation of ricin using infant formula as a food matrix. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (19), 2006, 7300.



1,5% em massa do farelo de mamona delipidado (AMBEKAR e DOLE (1957)⁶ citados por ANANDAN *et al.*, 2005; SAVY FILHO, 2005), está presente na quantidade de 6% a 9% em massa da baga (CANGEML, SANTOS e CLARO NETO, 2010) e foi classificada como uma substância de ameaça moderada (tipo B) pelo Centro Britânico de Controle e Prevenção de Doenças (CANGEML, SANTOS e CLARO NETO, 2010).

Lin e Li (1980) citados por Alexander *et al.*, (2008) relatam a existência de duas formas de ricina com atividade citotóxica: ricina D e E. As duas isoformas são constituídas por duas cadeias A e B e diferem quanto à toxicidade apenas em relação à massa molecular, ao ponto isoelétrico e à constituição da cadeia B.

A ricina D, objeto de estudo deste trabalho, é uma LEC heterodimérica, inibidora dos ribossomos, de classe II, extraída do endosperma das sementes da mamona, constituída por duas cadeias peptídicas (A e B) ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (-S-S-), com diferentes funções biológicas, cuja complexidade da molécula é dada em função da combinação dos resíduos de 17 aminoácidos essenciais (RAE) (BELTRÃO, 2009; BUTERA *et al.*, 2007; CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008; HOFFMAN *et al.*, 2007; OLSNES e KOZLOV, 2001).

A ricina D, ilustrada na **Figura 2.7**, é conhecida como RCA 60 (massa molecular \approx 60 kDa).



Figura 2.7– Estrutura 3D da RCA 60 obtida por cristalografia de raios X (ALEXANDER *et al.*, 2008). Cadeia A - enzimática (em branco, amarelo e rosa), cadeia B - lectina galactose (em verde) e ponte dissulfeto (em azul) (Adaptado de BRADBERRY, 2007).

⁶ AMBEKAR, V. R.; DOLE, K. K. Detoxification of castor cake. *Indian J. Dairy Sci.*, 10, 1957, 107.



A cadeia A (RCA-A 30, citotóxica, 32 kDa, 267 RAE) catalisa a depurinação de uma invariante adenina A4324 do rRNA 28S (quebra da ligação glicosídica entre a adenina e a ribose), bloqueando a síntese de proteínas, promovendo a morte celular quando ligada à cadeia B (RCA-B 30, lectina ligada a um açúcar, geralmente galactose, 32 kDa, 262 RAE) pela ponte dissulfeto (DAYAN-KENIGSBERG, BERTOCCHI e GARBER, 2008; HOFFMAN *et al.*, 2007; LORD, ROBERTS e ROBERTUS, 1994; OLSNES e KOZLOV, 2001). As duas cadeias juntas constituem uma das citotoxinas mais potentes da natureza, considerando que nenhum efeito tóxico é conhecido para as cadeias isoladas (HOFFMAN *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação da RCA 60, apresentado na **Figura 2.8**, assemelha-se ao mecanismo proposto para as demais proteínas inativadoras dos ribossomos II.

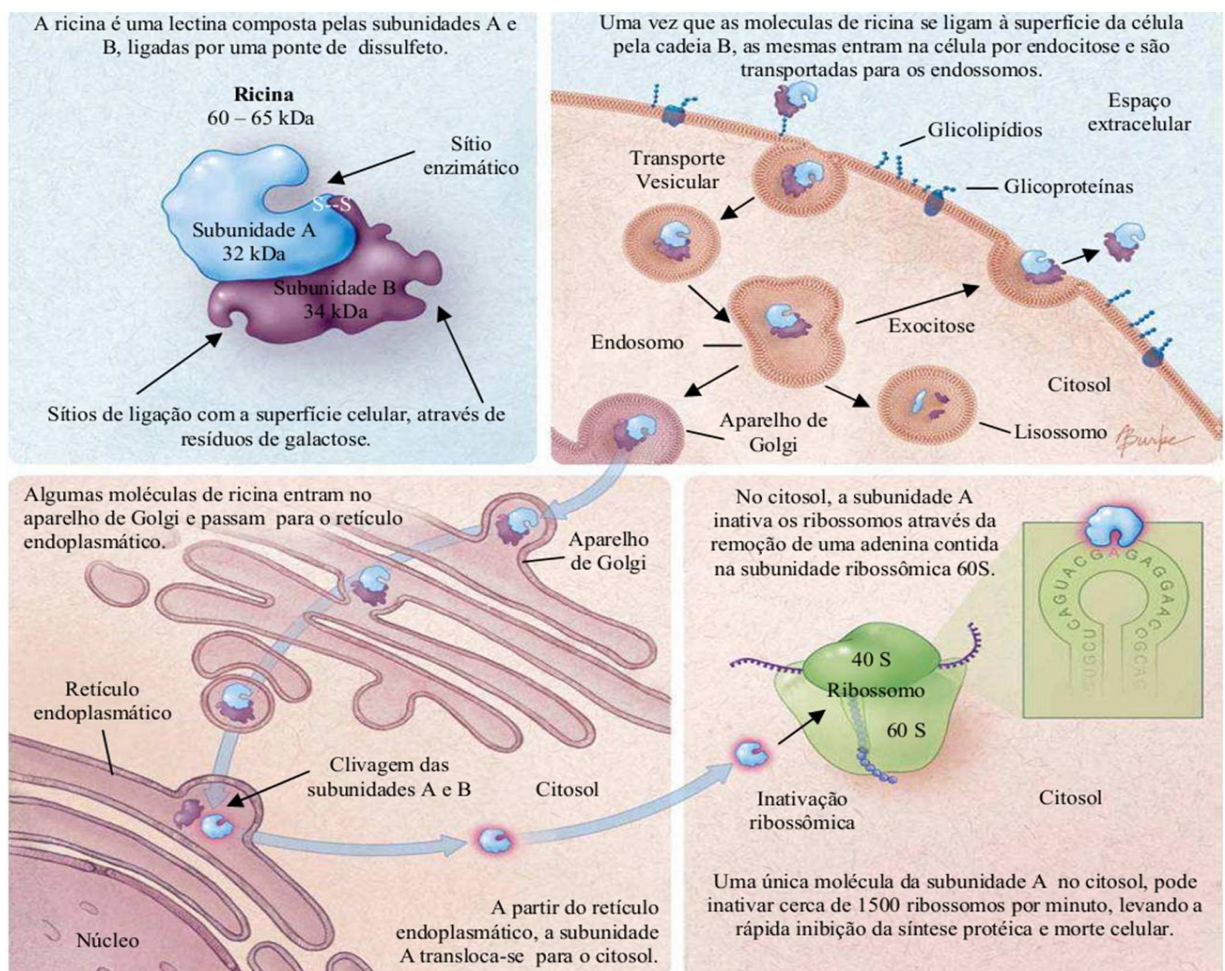


Figura 2.8– Mecanismo de ação da ricina (Fonte: AUDI *et al.*, 2007⁷ citado e adaptado por OLIVEIRA, 2010).

⁷ AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M. et al. Ricin poisoning: A comprehensive review. *The Journal of the American Medical Association*, 294 (9), 2005, 2342



A RCA 60 pode ser fatal, mesmo em pequenas doses, e ainda sem antídoto conhecido (CANGEML, SANTOS e CLARO NETO, 2010). Sua toxicidade aguda, atribuída essencialmente à inibição da síntese proteica, tem sido observada em animais, insetos e humanos, seja por inalação, ingestão ou injeção, tendo, por conseguinte, sido utilizada para produção de armas químicas, por causa dos seus efeitos extremos (HOFFMAN *et al.*, 2007; LUBELLI, *et al.*, 2006). É um veneno mortal e que tem como sintomas de intoxicação em indivíduos: problemas respiratórios, dores abdominais, febre e náusea. Até 1985 são conhecidos mais de 750 casos de intoxicação em humanos (RAUBER e HEARD, 1985).

Em meio aos avanços tecnológicos e da ciência, oficialmente, ainda não se conhece nenhum antídoto eficaz que reverta à ação da RCA 60 em organismos vivos. Pesquisas demonstraram que o uso de vacinas geneticamente modificadas com RCA-A 30, por exemplo, podem ser promissoras para inibir efeito de intoxicação por RCA 60, mediante a produção de anticorpos que bloqueiam os efeitos venenosos da toxina (FRANZ e JAAX, 1997).

Um dos fatores que constitui a essência para a avaliação toxicológica é a sua dose letal (DL_{50}). A DL_{50} é definida como a dose que possivelmente causará a morte de 50% da população em estudo. Esta dose geralmente é expressa em função da massa do agente tóxico inoculada (mg) por unidade de massa corpórea da espécie em estudo (kg). Os testes toxicológicos são realizados em camundongos ou cobaias e extrapolados para seres humanos, já que as reações comportamentais são similares às provocadas em organismos humanos.

Embora a DL_{50} para humanos adultos não esteja bem determinada, há trabalhos que citam ser letais dosagens na faixa de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SMALLSHAW *et al.*, 2002). Outros já estimam que a inalação ou administração intravenosa ou intraperitoneal de cerca de um miligrama desta toxina, quantidade geralmente presente em cinco sementes, é suficiente para levar um adulto de 75 kg ao óbito^{8,9}. Administrações em ratos sejam por inalação, via intravenosa ou intraperitoneal, revelam valores de DL_{50} , para RCA 60, na ordem de 3 a 5, 5 e 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$ da massa

⁸ Disponível em: <www.tsf.pt/PaginalInicial/Interior.aspx?content_id=792509&page=-1>. Acesso em 20 de jan. de 2012.

⁹ Fact sheet reicin. Disponível em: <http://www.labor-spiez.ch/en/dok/fa/pdf/riicin_e.pdf>. Acesso em 19 de fev. de 2012.



corpórea, respectivamente (FRANZ e JAAX, 1997¹⁰ citados por DAYAN-KENIGSBERG, BERTOCCHI e GARBER, 2008).

Em 1978, durante a Guerra Fria, Georgi Markov, escritor e jornalista búlgaro que vivia em Londres, morreu após ser atacado por um homem que injetou RCA 60 em seu organismo (HOFFMAN *et al.*, 2007; LINDSEY *et al.*, 2005; LUBELLI *et al.*, 2006; MACKINNON e ALDERTON, 2000). Há relatos de que a substância também foi usada na Guerra Irã-Iraque, durante os anos 80 (HOFFMAN *et al.*, 2007). Em 2003, descobriu-se RCA 60 em duas cartas interceptadas pelas autoridades postais dos EUA e uma delas era dirigida à Casa Branca. Concomitantemente, suspeitos terroristas foram presos por estarem purificando RCA 60, em apartamento em Londres (HOFFMAN *et al.*, 2007; LUBELLI *et al.*, 2006). Mais tarde¹¹, o FBI encontrou RCA 60 em uma sala dos correios (EUA, 2004), também na confecção de armas biológicas para ataques terroristas (EUA, 2005) e em 2006, Chetanand Sewraz foi preso por isolar a toxina, alegando ser para assassinar a sua mulher, e não como forma de bioterrorismo.

Paradoxalmente, de forma promissora na área médica, a RCA 60 está sendo testada em tratamentos de câncer e AIDS com o objetivo de destruir células indesejadas (LORD, ROBERTS e ROBERTUS, 1994; WOO, LEE e LEE, 1998). Para chegar ao alvo, a toxina é ligada a um anticorpo (função do sistema imunológico) que reconhece especificamente a célula que se deseja eliminar, possibilitando que a RCA 60 penetre a célula e provoque efeito tóxico (LORD, ROBERTS e ROBERTUS, 1994). Aliado às aplicações com propósito de tratamento médico encontra-se a demanda por métodos para quantificação de RCA 60.

A RCA 60 sólida ou liofilizada é estável à temperatura ambiente e a uma ampla faixa de pH. Entretanto é inativada pela ação da luz, calor e agentes oxidantes; quando em solução é menos estável que no estado seco. Nicolson *et al.*, (1974) relatam que a 65 °C a RCA 60 perde 50% da atividade, sendo totalmente inativada a 85 °C por três horas. Em condições normais, sua atividade é mantida entre pH 3,0 e 9,0.

¹⁰ FRANZ, D. R.; JAAX, N. K. Ricin toxin. In: SIDELL, F. R., TAKAFUJI, E. T., FRANZ, D. R. (Eds.). Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Walter Reed Army Medical Center, Washington USA, 1997. pp. 631-642.

¹¹ Disponível em: <<http://www.nawebti.net/ricina/index2.php?pag=casos>>. Acesso em 05 de fev. de 2012.



A literatura destaca algumas propriedades físico-químicas da RCA 60. Dentre elas apresentamos:

- ✦ pó branco¹²;
- ✦ solubilidade em água (CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008) e clorofórmio¹², ácido acético diluído¹³ e insolúvel em álcool¹²;
- ✦ constante de Michaelis para os ribossomos de 0,1 mmol L⁻¹ (FRANZ e JAAX, 1997);
- ✦ constante enzimática de 1,5 min⁻¹ (FRANZ e JAAX, 1997);
- ✦ absorção máxima no ultravioleta a 280 nm (FRÉNOY, 1986);
- ✦ ponto isoelétrico próximo a 7,2 (CHAI, LEE e TAKHISTOV, 2010).

2.2.1.1.1 Eletroquímica dos aminoácidos da RCA 60

De acordo com Chakravartula e Guttarla (2008) a estrutura primária da RCA 60 é constituída por 17 AA essenciais, totalizando cerca de 516 RAE, além da contribuição do AA Trp. A distribuição desses resíduos e sua participação em cada uma das cadeias formadoras da RCA 60 estão apresentadas na **Tabela 2.2**.

¹² Disponível em: <<http://www.nawebti.net/ricina/index2.php?pag=propriedades>>. Acesso em 19 de fev. de 2012.

¹³ Disponível em: <<http://www.cbwinfo.com/Biological/Toxins/ricin.html>>. Acesso em 19 de fev. de 2012.



Tabela 2.2– Resíduos de aminoácidos da RCA 60 (adaptado de CHAKRAVARTULA e GUTTARLA, 2008).

AA RCA 60	Número de resíduos		TOTAL
	RCA-A 60	RCA-B 60	
Asp	23	22	45
Thr	12	10	22
Ser	21	19	40
Glu	29	25	54
Cys	2	2	4
Gly	48	47	95
His	3	1	4
Ile	12	10	22
Leu	17	15	32
Lys	10	11	21
Met	2	1	3
Phe	6	7	13
Pro	18	16	34
Tyr	7	5	12
Ala	35	32	67
Val	13	11	24
Arg	13	10	23
TOTAL	271	244	515

Embora a tabela denote a existência de 515 RAE, esse número é estendido a 516, considerando alguma perda decorrente de hidrólise. No entanto, ambas as cadeias polipeptídicas apresentam composição similar, logo possuem massa molecular semelhante, estimada por espectroscopia de massa: RCA-A 30 (29.000 D) e RCA-B 60 (28.500 D). Outro fator observado pelos autores é que a RCA 60 é formada por AA hidrofóbicos (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro e Phe) e hidrofílicos (Gly, Ser, Thr, Cys e Tyr). Os autores acrescentaram que o AA Trp embora faça parte da estrutura da RCA 60, o método desenvolvido para caracterização não é adequado para sua determinação.

Dos AA supracitados, destacamos a Cys por apresentar em sua estrutura um grupo tiol (sulfidril, -SH) responsável pela formação da ponte dissulfeto, **Figura 2.9**. Esta é caracterizada como uma ligação covalente simples formada entre dois resíduos de Cys, catalisada pela oxidação de dois grupos tiol (BROCCHINI *et al.*, 2008) por enzimas específicas. Em adição é o cerne da estrutura da RCA 60, pois



desempenha papel importante na formação, a junção das duas cadeias polipeptídicas, conferindo estabilidade à proteína (WALL, 1971).

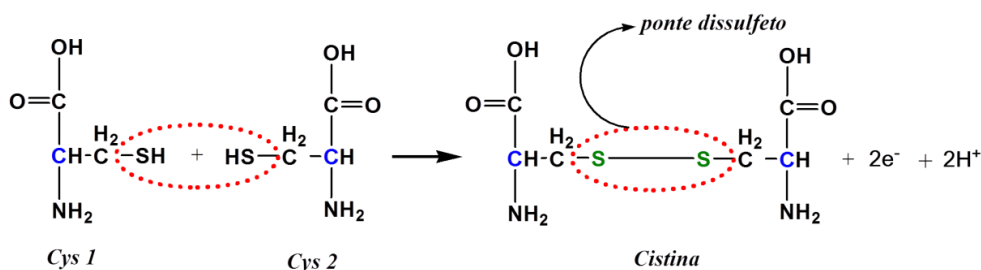


Figura 2.9– Formação de uma ponte dissulfeto entre duas cadeias laterais de cisteína.

A existência de densidade eletrônica π e a presença de heteroátomo favorecem a adsorção dos AA em superfícies metálicas. Nesse sentido, a eletroatividade desses compostos está associada à existência de grupos tiol e aromáticos em suas estruturas (MORENO *et al.*, 2010). Em adição, a oxidação eletroquímica de moléculas orgânicas pequenas é a chave para o entendimento dos processos eletroquímicos de moléculas de alta massa molecular, como o caso da RCA 60, fundamentando as aplicações electrocatalíticas (GU *et al.*, 2003). Nesse intuito, apresenta-se a seguir um pequeno levantamento bibliográfico acerca da eletroquímica dos AA constituintes da RCA 60.

Vilaseca *et al.*, (2008) propuseram a determinação indireta do AA Ala na sua forma derivada (feniltio de Ala), usando voltametria de redissolução catódica na modalidade onda quadrada. O estudo foi realizado em meio tampão fosfato pH 7,0 e 12,0 usando eletrodo de Hg. Uma pré-concentração por 50 s em -50 mV revelou um pico de redução irreversível em -0,630 V.

Santos *et al.*, (2011) investigaram a eletroatividade dos AA Glu e Arg visando explicar o mecanismo de reação da hepatotoxina nodularina. Nenhuma resposta eletroativa foi observada em eletrodo de CV. Estes estudos foram recentemente corroborados por Lopes *et al.*, (2012) ao investigar a oxidação eletroquímica da cianobactéria Microcistina LR. Os autores observaram também a não eletroatividade dos AA Leu, Ala e Asp (30 e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (valores de pH de 5,3 e 7,0) usando um eletrodo de CV associado a VPD, VOQ e VC.

Rezaei e Zare (2008) provaram ser viável a oxidação eletroquímica do AA Leu ($9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre um eletrodo de CV modificado com nanotubos de carbono.



Este apresenta excelente atividade electrocatalítica frente aos estudos em CV liso, observados por [Lopes et al., \(2012\)](#).

[Huerta et al., \(1998\)](#) estudaram o comportamento electroquímico do AA Gly ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) sobre eletrodos de platina (Pt100) usando VC. Um pico anódico irreversível foi identificado em $+0,39 \text{ V}$ usando meio ácido. Estudos similares foram realizados para os AA Ser e Ala usando eletrodos de platina e meio ácido ([HUERTA et al., 1999](#)). Os resultados voltamétricos sugerem que a oxidação do AA Ser começa entre $+0,3$ e $+0,4 \text{ V}$, ao passo que a da Ala começa em $+0,3 \text{ V}$. Ambos os processos de oxidação podem estar associados à adsorção de cianeto formado nas fases iniciais da oxidação da Ser e da Ala, como foi observado também para o composto de origem de Gly ([HUERTA et al., 1999](#)).

[Chen, Chang e Chang \(2008\)](#) estudaram a oxidação electroquímica do AA His ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução neutra sobre um eletrodo de DDB oxidado anodicamente. A oxidação electroquímica da His foi observada em $+1,5 \text{ V}$, sendo a resposta electroquímica inibida devido à forte adsorção de produtos de oxidação na superfície do eletrodo.

[Fiorucci e Cavalheiro \(2002\)](#) desenvolveram um método voltamétrico para a determinação do AA Trp em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de PC. Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão fosfato e Britton-Robinson pH 7,4 para o Trp ($5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) revelaram um pico de oxidação $\approx +0,75 \text{ V}$. Mais tarde, [Wu et al., \(2004\)](#) estudaram a oxidação electrocatalítica do AA Trp ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) sobre eletrodo de CV quimicamente modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Para estudos de VC e VPD, um pico de oxidação $\approx +1,0 \text{ V vs. ECS}$ foi identificado para o eletrodo de CV liso em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,5), sendo deslocado negativamente 40 mV com o eletrodo modificado.

[Zhao, Qi e Tian \(2006\)](#) mostraram ser possível a determinação direta e simultânea dos AA Trp e Tyr sobre eletrodo de DDB. Uma sobreposição de picos foi observada em uma ampla faixa de pH, sendo resolvidos em meio alcalino (pH 9,8 e 11,2). Os processos de oxidação foram caracterizados em $+1,12 \text{ V}$ e $+1,56$ para os AA Trp ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e Tyr ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$), respectivamente.

[Enache e Oliveira-Brett \(2011a\)](#) estudaram prováveis caminhos para a oxidação electroquímica de compostos indólicos em eletrodo de CV. Entre estes



referenciaram o AA Trp. Os autores reforçam que o esclarecimento das vias de oxidação pode delinear um modelo útil para explicar o mecanismo de transferência de elétrons em proteínas que constituem esse AA, sobre superfícies sólidas. Dois picos de oxidação irreversível (+0,65 V e +1,05 V) foram vistos em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 7,0, para uma concentração de Trp 25 μmol L⁻¹.

[Cheng, Pacey e Cox \(2001\)](#) investigaram a oxidação eletroquímica do AA Met em pH fisiológico (tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹) sobre um eletrodo de CV liso e quimicamente modificado por camadas de rutênio. A presença de 0,2 mmol L⁻¹ de Met promoveu um ganho de sensibilidade para o pico anódico (+1,0 V) de corrente usando o eletrodo modificado, quando comparado com o CV liso (≈ +0,9 V).

[Agüí et al., \(2004\)](#) construíram um sensor de PC quimicamente modificado com partículas coloidais de ouro e cisteamina para a determinação do AA Met. O potencial de pico apresentou uma dependência linear com o aumento do pH (4,0 ≤ pH ≤ 9,0), revelando uma inclinação de -60 mV/pH o que indica que o processo redox envolve o mesmo número de prótons H⁺ e elétrons, estimado em 4. Estudos de interferentes usando os AA Trp, Tyr, Leu, Arg e Val, em níveis de concentração de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, não exibem respostas voltamétricas de pulso diferencial diferenciadas da corrente de fundo na faixa de potencial varrida (-0,1 a 1,2 V). No entanto, os AA Glu, Gly, His, Lys e Cys originaram picos de oxidação bem diferenciados e próximos ao potencial de pico da Met (≈ +0,9 V), comparados com o voltamograma da linha de base. Uma análise crítica desses dados, contradizem a não eletroatividade dos AA Glu e Arg em CV vista por [Santos et al., \(2011\)](#) e [Lopes et al., \(2012\)](#) e do AA Leu por [Lopes et al., \(2012\)](#). Discordâncias também podem ser apontadas quanto à eletroatividade vista por [Zhao, Qi e Tian \(2006\)](#) para os AA Trp e Tyr.

[Enache e Oliveira-Brett \(2011b\)](#) realizaram o estudo eletroquímico dos AA Cys e Met sobre um eletrodo de CV e DDB. Um comportamento eletroquímico similar foi observado para o AA Cys sobre os dois eletrodos (CV 150 μmol L⁻¹ e DDB 75 μmol L⁻¹) para valores de pH entre 1,0 e 8,0. Três picos de oxidação em pH 7,0 foram identificados nos seguintes valores de potenciais aproximados: +0,4 V, +0,8 V e +1,2 V. O AA Met apresenta dois processos de oxidação irreversível, ≈ +1,1 V e +1,35 V para os dois eletrodos testados em pH ácido. Apenas o pico em ≈ +1,35 V



aparece em pH neutro e alcalino. Detalhes inerentes ao mecanismo serão aprofundados na seção 4.2.4.

Pesquisas utilizando nanopartículas de ouro foram utilizadas como agente modificante ao eletrodo de CV, visando investigar o comportamento eletroquímico do AA Tyr ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), bem como sua determinação (CHENG, CHEN e ZHANG, 2009). O processo de oxidação da Tyr foi observado em tampão fosfato pH 7,0, sendo identificado um pico em +0,8 V usando eletrodo de CV, sendo deslocado para +0,69 V devido à atividade eletrocatalítica promovida pelo eletrodo modificado.

Pesquisas bibliográficas sistematizadas, usando as palavras-chave “Threonine and voltammetry”, foram conduzidas utilizando-se as bases de dados *ISI Web of Knowledge* e a plataforma *Scielo*, a fim de averiguar estudos eletroquímicos com o AA Thr. Nenhum resultado relacionado foi encontrado.

A imobilização de moléculas biológicas e orgânicas (oligonucleotídeos e peptídeos) sobre superfícies sólidas condutoras tem sido utilizada de forma promissora para o reconhecimento de outras moléculas de interesse. Esta prática tem sido usada fortemente, principalmente, para a imobilização de superfícies com moléculas ricas em enxofre (HUAN, SHEN e YU, 2004; LI, 2006; McTIERNAN, OMRI e CHAHMA, 2010).

2.3 Métodos analíticos aplicados à análise da RCA 60

A detecção de proteínas, incluindo marcadores de câncer tem despertado cada vez mais o interesse das pesquisas científicas (EINAGA, 2010). Ao lado da detecção de RCA 60 em fluídos biológicos ou tecidos, a determinação em amostras ambientais, bebidas ou matrizes alimentícias é de extrema importância, uma vez que esta proteína tem uso para ações terroristas (MUSSHOFF e MADEA, 2009), requerendo o uso de métodos químicos, biológicos e microscópicos para sua análise (ALEXANDER *et al.*, 2008).

Os principais métodos analíticos para a detecção e determinação de RCA 60 de maior equilíbrio entre confiabilidade, praticidade e sensibilidade são aqueles que empregam separações cromatográficas e eletroforéticas, biossensores e ensaios imunológicos, sobretudo as análises *screening* (ELISA - *Enzyme Linked*



Immunosorbent Assay) (HOFFMAN *et al.*, 2007). Estes métodos apresentam alguns inconvenientes: são laboriosos, dispendiosos, requerem mão-de-obra especializada, envolvem diversas etapas e provas bioquímicas, além de equipamentos sofisticados. A literatura também reporta ser possível a determinação de RCA 60 por espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e fluorimetria (BRITO, 2005).

Recentemente Musshoff e Madea (2009) sumarizaram uma sequência de métodos empregados para a detecção de RCA 60 baseada em aspectos toxicológicos forenses. Alguns estudos, empregando diferentes metodologias, estão elencados como segue:

- O método convencional de análise da RCA 60 utiliza a eletroforese capilar com dodecilsulfato de sódio em gel de poliacrilamida (ISHIGURO *et al.*, 1964; KABAT, HEIDELBERGER e BEZER, 1947; WALLER e NEGI, 1958).
- A eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas com ionização/dessorção da matriz assistida por laser possibilitou a caracterização e diferenciação de várias formas de RCA 60 (DESPEYROUX *et al.*, 2000; NA *et al.*, 2004)
- Koja, Shibata e Mochida (1980) desenvolveram uma metodologia para medição da RCA 60 utilizando ELISA com o anticorpo antiricina de coelho. Limites de detecção (LD) da ordem de 40 ng mL^{-1} foram encontrados para detecção colorimétrica da glicoproteína em fluídos biológicos. Posteriormente outros autores desenvolveram métodos ainda mais sensíveis para uso médico, destinados a medir a concentração da proteína em fluídos biológicos como o sangue ou plasma e urina humana, a exemplo do método ELISA com quimiluminescência com LD 100 pg mL^{-1} (POLI *et al.*, 1994), biosensores com fibras ópticas (NARANG *et al.*, 1997) e imunodifusão radial (PINKERTON *et al.*, 1999).
- Godal, Olsnes e Pihl (1981) e Ramakrishnan, Eagle e Houston (1982) utilizaram a técnica de radioimunoensaio associada ao uso do tampão de



antissoro de coelhos, possibilitando a detecção de níveis tão baixos quanto 10 pg de RCA 60.

- ✦ [Leith, Griffiths e Green \(1988\)](#) propuseram um método sanduíche ELISA para detectar RCA 60 em tecidos corporais com uma sensibilidade de apenas 20 pg mL⁻¹, através de administração intramuscular. Mais tarde, [Cook, David e Griffiths \(2006\)](#) comprovaram que o ensaio foi suficientemente sensível para detectar quantidades mensuráveis de RCA 60 em tecidos, por meio de administração via pulmonar ou oral até 48 h após a exposição.
- ✦ As limitações impostas pelo método ELISA clássico foram a razão da introdução da detecção de fluorescência induzida a laser, utilizado por [Narang et al., \(1997\)](#) para detecção da glicoproteína em tampão (LD 100 pg mL⁻¹) e água de rio (LD 1 ng mL⁻¹) em um tempo de ensaio de 20 min. Este tempo de ensaio foi reduzido para 10 min através do uso de partículas coloidais de ouro, empregadas por [Shyu et al., \(2002\)](#). Um LD 50 ng mL⁻¹ foi obtido para detecção de RCA 60 em tampão com base em anticorpos monoclonais, alcançando 100 pg mL⁻¹ empregando amplificadores de prata.
- ✦ O uso de microchip de proteína baseado em hidrogel ([RUBINA et al., 2005](#)) ou arranjo de biosensores ([LIGLER et al., 2003](#); [FELTIS et al., 2008](#)) foi apresentado como alternativa promissora ao uso de imunoenaios.
- ✦ [Terazawa et al., \(1989\)](#) detectaram RCA 60 por eletroforese capilar, que permite a separação e purificação rápida de misturas complexas usando o procedimento do mordente de prata e ouro para evidenciar a presença de veneno em tecido muscular, a partir do local de injeção em vítimas mortas, sendo capaz de detectar menos que 10 pg desta toxina.
- ✦ [Darby, Miller e Allen \(2001\)](#) descreveram a espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida com eletrospray e a dessorção/ionização da matriz assistida por laser associada a um tempo de vôo, para a identificação da RCA 60.

Na década de 60, a ineficiência no controle da qualidade no processo de detoxificação da torta da mamona, chamada Lex Protéico, pela empresa brasileira



SAMBRA (Campina Grande-PB), acarretou a suspensão do produto comercial no Brasil (HOFFMAN *et al.*, 2007). Em outros países, há indicações do uso da trota como ração animal. Isso tem sido sinalizado pelas pesquisas desenvolvidas por Anandan *et al.*, (2005). Entretanto, a utilização da torta da mamona como ração animal e/ou adubo orgânico, após processo de detoxificação, justifica a adoção de metodologias analíticas. Pois, sendo a RCA 60 uma proteína extremamente tóxica, o seu controle é uma demanda da sociedade e dos produtores de mamona.

As técnicas eletroanalíticas estão sendo utilizadas para estudos que englobam as diversas áreas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química objetivando-se a obtenção de informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Uma grande vantagem destas técnicas consiste na possibilidade da medição ser realizada diretamente na amostra sem necessidade de etapas de pré-purificações ou de separações prévias, além de tornar possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas. Estas vantagens aliadas ao curto tempo para realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados e a alta imunidade em relação à presença de interferentes, fazem com que sejam cada vez mais utilizadas, quando comparadas as demais técnicas citadas inicialmente.

Técnicas eletroanalíticas têm sido empregadas para estudar a interação direta entre proteínas e eletrodos. A oxidação eletroquímica direta de proteínas sobre a superfície do eletrodo se baseia na oxidação de metais, de íons ou dos próprios AA eletroativos da estrutura da proteína (EINAGA, 2010). Em adição, o autor afirma que o pequeno número de trabalhos empregados para a determinação de proteínas por técnicas voltamétricas é limitado não só devido à sua complexidade estrutural, mas também pela forte adsorção incidente sobre a superfície eletródica, podendo comprometer a magnitude do sinal analítico, influenciando diretamente a reprodutibilidade das medidas.

Embora não exista na literatura nenhum estudo voltamétrico para a determinação de RCA 60, dois trabalhos foram identificados e fazem uso de metodologias baseadas na medida de corrente elétrica, a saber:



- ✦ [Suresh et al., \(2007\)](#) construíram um imunossensor amperométrico usando eletrodo impresso descartável constituídos por poliestireno e grafite para detecção de RCA 60 em amostras de água. Verificou-se que a resposta do sensor amperométrico em 0,4 V vs. Ag/AgCl é proporcional ao logaritmo da concentração da RCA 60 a partir de 100 ng mL⁻¹ a 3.200 ng mL⁻¹.
- ✦ [Suresh et al., \(2010\)](#) propuseram o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico usando eletrodos de grafite e pasta de nanotubos para detecção de RCA 60 em amostras de água. O LD foi comparado para ambos os eletrodos. Verificou-se que a resposta do sensor amperométrico em 0,4 V vs. Ag/AgCl é proporcional à concentração da glicoproteína em ambos os casos e é linear na faixa de 0,625 a 25 ng mL⁻¹ para o eletrodo a base de nanotubos e para o eletrodo de grafite é 2,5 a 25 ng mL⁻¹.

2.4 Técnicas eletroquímicas

Os métodos eletroquímicos são constituídos por um conjunto de técnicas eletroanalíticas. Dentre estas técnicas, destaca-se a voltametria, na qual as informações sobre o analito baseiam-se na medida da corrente, resultante de uma reação de oxidação ou redução, decorrente de uma eletrólise na superfície de um eletrodo de trabalho durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica, de modo que a transferência de elétrons seja favorecida cineticamente ou termodinamicamente, obedecendo à lei de Nernst ([BRETT e BRETT, 1996](#); [BARD e FAULKNER, 2001](#); [SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002](#); [SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003](#); [WANG, 2000](#)). Do ponto de vista cinético, a etapa lenta determina a velocidade da reação, visto que as reações eletródicas podem ocorrer em várias etapas. Classicamente, os processos redox que ocorrem na interface eletrodo-solução são governados por transferência de massa (transferência da espécie do corpo da solução para a interface eletrodo-superfície) e transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo, que ocorre numa região de interface eletrodo-solução, chamada de dupla camada elétrica), seguido pela volta do produto da reação formado na superfície eletródica para a solução ([BARD e FAULKNER, 2001](#); [WANG, 2000](#)).



O transporte de massa pode ocorrer por migração (movimento de íons através da solução causada pela atração ou repulsão entre as espécies iônicas em solução e o eletrodo de trabalho), por convecção (movimentação das espécies causadas por perturbação mecânica do fluxo da solução) e por difusão (movimentação espontânea da espécie química devido à formação de um gradiente de concentração do analito). Os processos de migração e convecção são minimizados quando utilizamos um excesso de eletrólito suporte (impede a formação de um campo elétrico devido ao gradiente de cargas) e cessa-se o distúrbio mecânico da solução (agitação mecânica, borbulhando gás antes da aplicação do potencial de trabalho), respectivamente. Desse modo, o transporte de massa em voltametria é realizado basicamente por difusão (BARD e FAULKNER, 2001; WANG, 2000).

As principais técnicas voltamétricas empregadas em eletroanálises são: voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).

2.4.1 Voltametria cíclica

A VC é considerada uma ferramenta poderosa e versátil para estudar reações eletroquímicas. Nesse contexto, é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre estes processos e a sua eficiência resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons (mecanismos de reação redox) e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos sobre a superfície de eletrodos. Além disso, nos possibilita investigar a reatividade química das mais diferentes espécies, assim como avaliar a reversibilidade dos processos eletroquímicos, favorecendo a realização de estudos exploratórios quando não se possui informações sobre a eletroatividade do analito em estudo (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; WANG 2000).

A VC é uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial



final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico, para processos reversíveis ou quase-reversíveis, cujos parâmetros eletroquímicos mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}), e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; WANG, 2000; ZOSKI, 2006). A **Figura 2.10** ilustra o sinal de excitação e os voltamogramas cíclicos registrados, caracterizando a reversibilidade dos processos eletroquímicos.

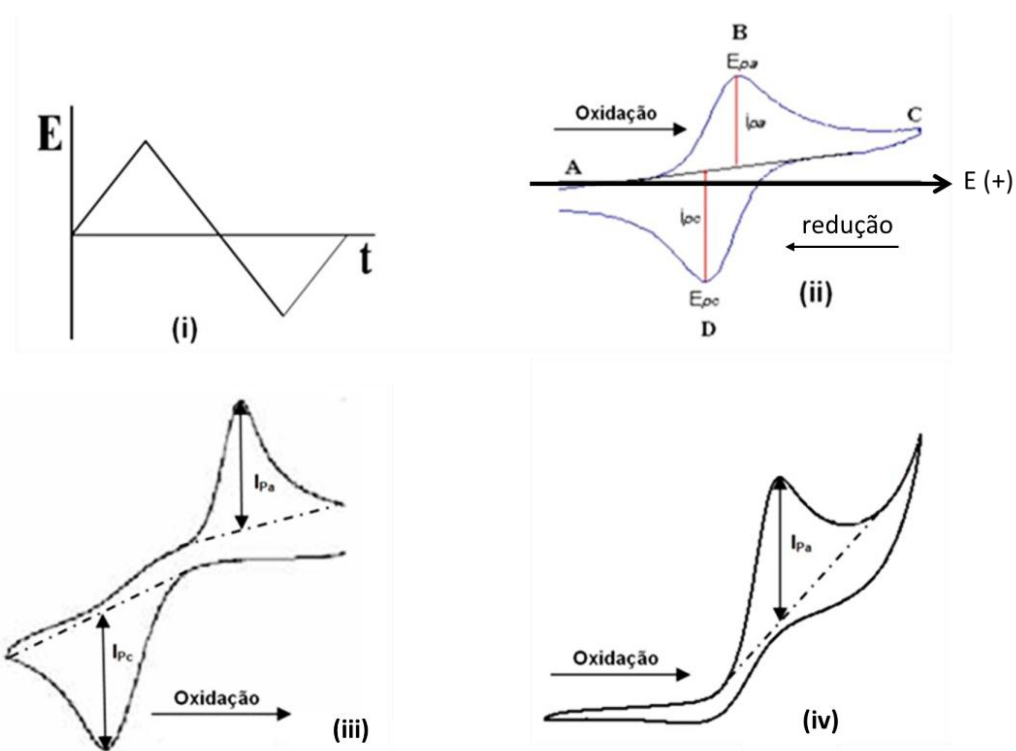


Figura 2.10– (i) Sinal de excitação para VC e voltamogramas cíclicos esquemáticos para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv) (adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Os testes diagnósticos da VC são baseados na dependência do potencial de pico e da corrente de pico em função do estudo da variação da velocidade de varredura e permitem obter, principalmente, informações acerca da reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons e da presença de reações químicas acopladas (GREEF *et al.*, 1985). Os testes diagnósticos para caracterização de cada tipo de processo redox estão descritos na **Tabela 2.3**.



Tabela 2.3– Testes diagnósticos para processos redox usando VC (Adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#); [BARD e FAULKNER, 2001](#)).

REVERSÍVEIS	QUASE REVERSÍVEIS	IRREVERSÍVEIS
$I_p \propto v^{1/2}$	I_{pc} aumenta com v	$I_{pc} \propto v^{1/2}$
$ I_{pa}/I_{pc} = 1$	$ I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha = 0,5$	ausência de pico reverso
$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ (mV)	$\Delta E_p > 59/n$ (mV) e aumenta com v	$ dE_p/d\log v = 29,6/(\alpha n')$ (mV)
$ E_p - E_{p/2} = 56,6/n$ (mV)	-	$ E_p - E_{p/2} = 47,7/(\alpha n')$ (mV)
E_p independe de v	E_{pc} desloca negativamente com o aumento de v	E_p depende de v

2.4.2 Técnicas voltamétricas de pulso

A possibilidade de interfaciamento com equipamentos eletroquímicos para o controle digital da perturbação imposta ao eletrodo de trabalho, assim como da medida do sinal resultante, possibilitou o desenvolvimento das técnicas voltamétricas, em especial das técnicas de pulso que, na década de 50, começaram a substituir as técnicas polarográficas até então utilizadas ([SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003](#)).

As técnicas de pulso são amplamente adotadas em eletroanalítica para a determinação de espécies eletroativas, devido às elevadas sensibilidades obtidas, particularmente na presença de correntes com ruídos de fundo, tal como aquelas que podem resultar da redução do oxigênio dissolvido. Nestas técnicas, a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada elétrica; e a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a $t^{-1/2}$. O decaimento da corrente capacitiva, após a aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido que o da corrente faradaica ([SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003](#)). Assim, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter sido minimizada, conforme **Figura 2.11**.

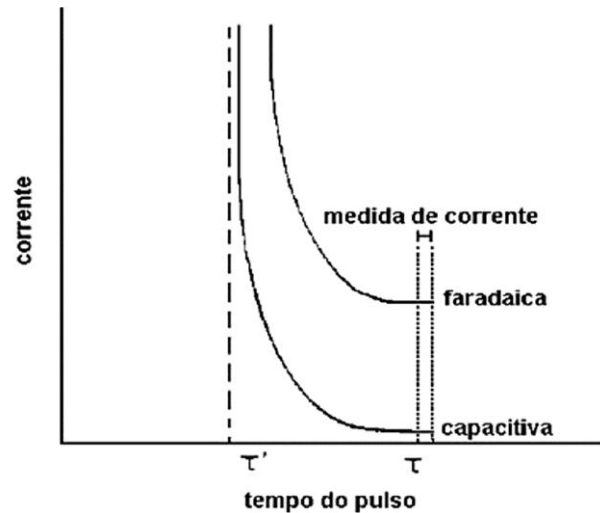


Figura 2.11– Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (Fonte: [SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003](#)).

2.4.2.1 Voltametria de pulso diferencial

Na VPD, pulsos de potencial sucessivos de igual amplitude (ΔE_p) são aplicados sobre uma rampa linear ou escada de potencial com incremento (ΔE_s) em intervalos de tempo e a corrente é medida antes do pulso ser aplicado (I_1) e logo no final do pulso (I_2), **Figura 2.12A**. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é principalmente a contribuição da corrente capacitiva e a segunda a contribuição da corrente faradaica, e então registradas contra o potencial, gerando o voltamograma de pulso diferencial, **Figura 2.12B**, ([BRETT e BRETT, 1996](#); [BARD e FAULKNER, 2001](#); [SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002](#)).

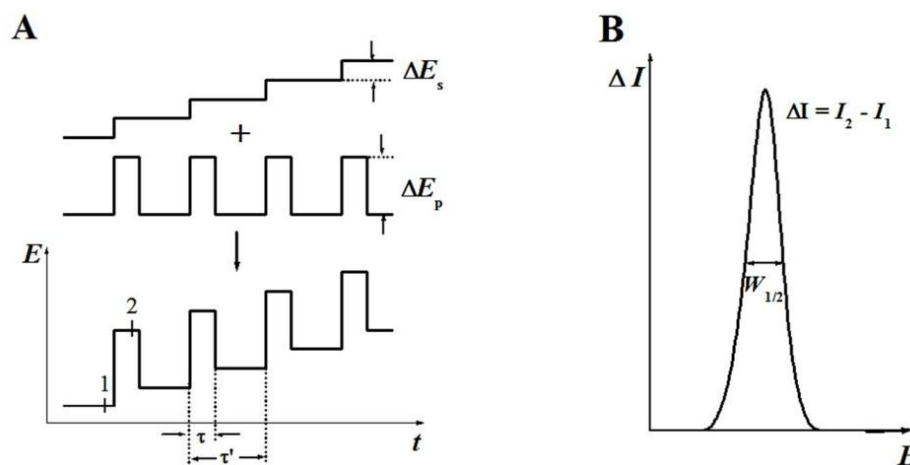


Figura 2.12– (A) Sinal de excitação para VPD e (B) Resposta típica (Adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#); [SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002](#)).



O tempo τ durante o qual o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de pulso, e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s e a velocidade de varredura $v = \tau \Delta E_s$. Em VPD a v varia normalmente entre 1 e 10 mV s⁻¹.

A amplitude escolhida para o pulso de potencial (ΔE_p) deve levar em consideração a reação em estudo e a sensibilidade exigida, uma vez que, grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir a possibilidade de detectar a corrente faradaica. Para pequenas amplitudes de pulso, a largura a meia altura ($W_{1/2}$) do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($90/n$), o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. A intensidade da corrente de pico (I_p) é diretamente proporcional à concentração do analito, mas também depende da velocidade da reação eletroquímica (BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; ZOSKI, 2006).

2.4.2.1 Voltametria de onda quadrada

A VOQ foi criada em 1953, quando Barker e colaboradores estudavam uma maneira de compensar a corrente capacitiva residual obtida nas análises polarográficas. Com o progresso da tecnologia analógica e digital, apenas nos anos 80, estudos realizados por Osteryoung, puderam incorporá-la nos polarógrafos, devido a sua forma de varredura rápida (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A VOQ é uma técnica em que a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, onde pulsos de potencial (ΔE_p) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_s) e duração $2t_p$ (período). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto (A-catódico) e reverso (B-anódico), originando um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado (ΔI), o qual é um sinal obtido diferencialmente, e apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA,



MACHADO e AVACA, 2003). Esta medida precede um tempo inicial (t_i) em que o eletrodo de trabalho é polarizado a um potencial em que a reação redox não ocorre.

Nesta técnica o regime de amostragem permite obter como resposta três tipos de curvas: a corrente I_1 (ou I_d) registrada no final do pulso de potencial direto – corrente direta, a corrente I_2 (ou I_r) registrada no final do pulso reverso – corrente reversa e a corrente total ou resultante (ΔI ou I_t) que corresponde à diferença entre essas duas. A corrente I_2 possui sinal contrário a I_1 (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; ZOSKI, 2006). O sinal de excitação e os voltamogramas correspondentes às amostragens de corrente estão apresentados na **Figura 2.13**.

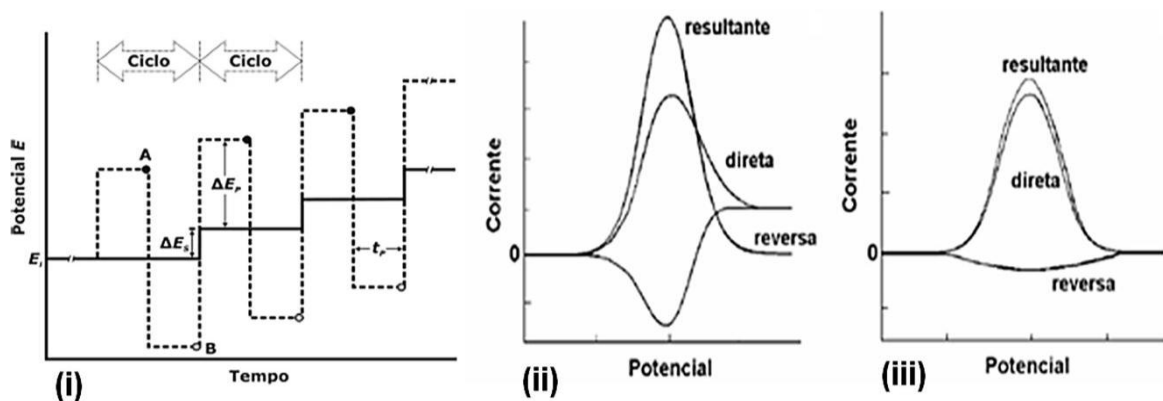


Figura 2.13– (i) Sinal de excitação para VOQ e Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (ii) e de um sistema irreversível (iii) (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A VOQ apresenta as seguintes vantagens em comparação às outras técnicas de pulso (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003):

- redução no ruído de fundo por meio de varreduras repetitivas;
- registro de correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura (pode alcançar até 1 V s^{-1}), com excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a faradaica, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica;
- baixo consumo de espécies eletroativas e redução nos problemas de passivação dos eletrodos;



- ✦ em muitos casos, a interferência do O₂ dissolvido é pouco significativa em medidas com VOQ;
- ✦ a velocidade efetiva para uma análise por VOQ é dada pelo produto da frequência (f) de aplicação de pulso e ΔE_s .

Os testes de diagnósticos da VOQ são baseados na dependência do potencial de pico e da corrente de pico em função do estudo da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial e permitem obter, principalmente, informações a cerca da reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Os testes diagnósticos para caracterização de cada tipo de processo redox estão descritos na

Tabela 2.4.

Tabela 2.4– Testes diagnósticos para processos redox usando VOQ (Adaptado de SOUZA; MACHADO e AVACA, 2003).

SISTEMA	DIAGNÓSTICOS	
	Relação I_p e f	Relação E_p e $\log f$
IRREVERSÍVEL	$I_p = kf$ (linear)	$\Delta E_p/\Delta \log(f) = -59/\alpha n$ (mV) (com R*, ou R e P** adsorvido)
REVERSÍVEL	$I_p = kf^{1/2}$ (linear)	$\Delta E_p/\Delta \log(f) = -29/n$ (mV) (sem adsorção do P) Relação não linear (com adsorção do P e do R)
QUASE-REVERSÍVEL	Não linear	Não linear

* R = reagente; ** P = produto

2.4.3 Voltametria de Redissolução (Stripping Voltammetry)

As técnicas de stripping estão associadas às reações eletroquímicas em que o analito é pré-concentrado no eletrodo de trabalho antes da varredura e aquisição de sinal inicial. Como consequência, um aumento da magnitude da corrente medida é obtido, com diminuição significativa dos limites de detecção alcançados para estas espécies químicas. As principais técnicas que se utilizam de processos de pré-



concentração são: stripping voltamétrico anódico e stripping voltamétrico catódico. A pré-concentração pode ser realizada por adsorção ou aplicando-se um potencial de deposição. As análises por stripping envolvem três etapas: deposição, equilíbrio e stripping. A **Figura 2.14** esquematiza os processos stripping anódico e catódico. Para ambos os processos, a etapa de pré-concentração consiste de uma eletrodeposição a potencial constante e controlado da espécie eletroativa sobre um eletrodo estacionário. Esta etapa é seguida por uma etapa de repouso (equilíbrio) e uma de determinação, esta última consiste na redissolução de volta à solução da espécie anteriormente eletrodepositada.

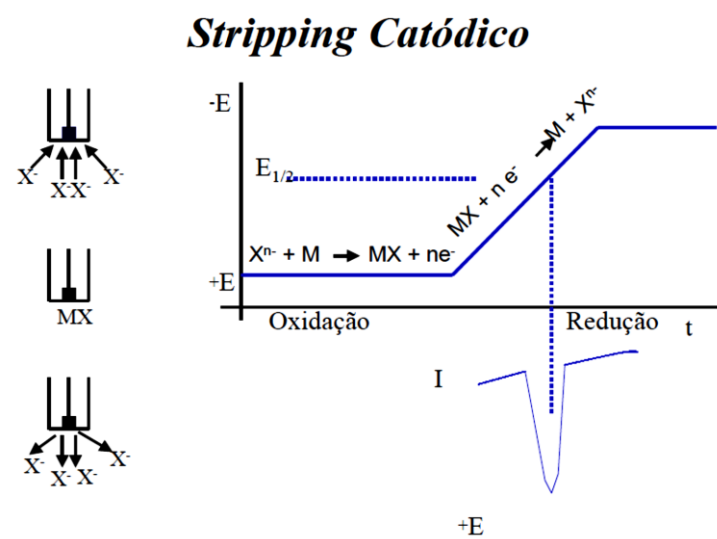
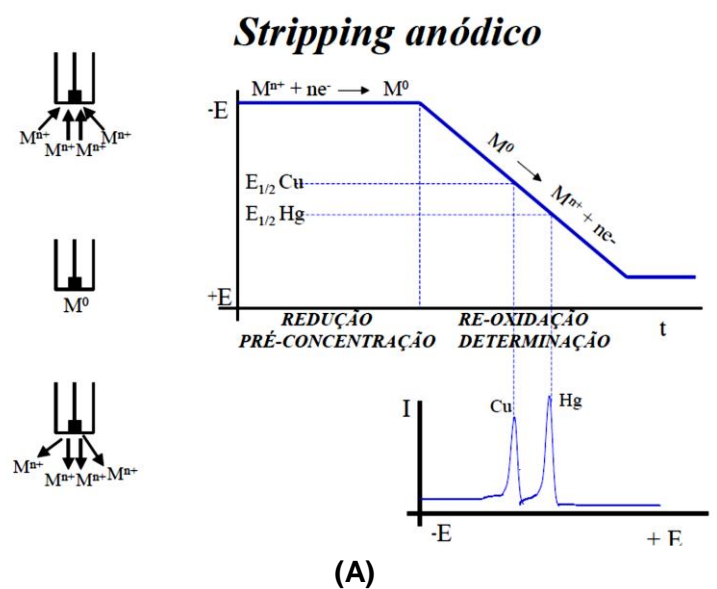


Figura 2.14– Etapas envolvidas no stripping anódico (A) e catódico (B).



2.5 Eletrodos de trabalho: carbono vítreo e diamante dopado com boro

Associada à versatilidade das técnicas voltamétricas, a escolha do material do eletrodo de trabalho deve conferir elevada sensibilidade, seletividade e, fundamentalmente, estabilidade em aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas. Os eletrodos de ouro, cobre, prata e platina, carbono vítreo (CV), fibra de carbono, grafite pirolítico (GP) e pasta de carbono (PC) (mistura composta, em geral, por óleo mineral e pó de grafite e/ou uma fração de um modificante, no caso de modificação na pasta) têm sido empregados para estudar a cinética, o mecanismo de transferência de elétrons e o processo de eletrodo, principalmente para evitar o uso do eletrodo de mercúrio, devido à toxicidade deste metal (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA; MACHADO e AVACA, 2003; USLU e OZKAN, 2007).

Um fator importante à escolha do eletrodo de trabalho é a sua condutividade elétrica. Em geral, os eletrodos à base de carbono apresentam uma ampla janela de potencial, baixas correntes de fundo e inércia química, quando comparados aos eletrodos confeccionados por metais nobres, como o ouro e a platina. No entanto, estes últimos apresentam elevadas taxas de transferências de elétrons frente aos eletrodos de carbono (USLU e OZKAN, 2007).

Uma das limitações encontradas para trabalhar com eletrodos sólidos em determinações eletroanalíticas diretas de compostos orgânicos tóxicos presentes em diferentes matrizes, em especial o eletrodo de CV, é a dificuldade de regeneração da superfície em decorrência de envenenamento superficial, principalmente devido à adsorção e/ou insolubilidade de produtos da oxidação destes compostos na superfície do CV, que bloqueiam a resposta voltamétrica de um dado analito, diminuindo a sensibilidade e a reprodutibilidade das medidas eletroquímicas (GARPELLINI, AVACA e SALAZAR-BANDA, 2010).

Como alternativa a literatura reporta o uso de eletrodos de diamante após dopagem com algum material condutor, uma vez que o diamante puro possui características isolantes (BARROS *et al.*, 2005). A necessidade de implementação de um método para dopagem de filmes de diamante crescidos em laboratório, especialmente as dopagens com o elemento químico boro (proveniente do



trimetilboro em concentrações entre 10 e 20.000 ppm), constituindo os eletrodos de DDB, que tem ganhado força nos últimos anos por apresentarem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outros eletrodos comumente usados, tais como CV, GP, PC e Hg (MEDEIROS *et al.*, 2008; PEDROSA, CODOGNOTO e AVACA, 2003).

O eletrodo de DDB apresenta vantagens em relação ao CV como baixas e estáveis correntes de fundo, resultando linhas de base com intensidades de corrente cerca de 10 vezes menor do que em CV, considerando áreas similares (TROUILLON e O'HARE, 2010; CHAILAPAKUL *et al.*, 2001).

Dois principais métodos são estabelecidos na literatura para promover a dopagem dos filmes semicondutores de diamante (BARROS *et al.*, 2005): crescimento a alta-pressão/alta-temperatura (HPTH, do inglês: *high-pressure/high-temperature*), (BUNDY, 1963), e deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente (HF-CVD, do inglês: *hot filament-chemical vapor deposition*) (MATSUMOTO *et al.*, 1982). Este último requer temperaturas da ordem de 1670 K e pressões subatmosféricas, da ordem de 1.000 a 10.000 Pa e baseia-se na deposição de um filme de diamante sobre diferentes tipos de substratos: o próprio diamante sob condições termodinamicamente metaestáveis, a partir da ativação de uma fase gasosa introduzida em um reator.

Os reagentes gasosos mais empregados são: metano altamente diluído em hidrogênio (mistura 0,3 a 1,0%), metanol, acetona, etanol, além de pequenas frações de oxigênio e compostos halogenados, no intuito de aumentar a taxa de crescimento e/ou a qualidade final dos filmes crescidos com características semicondutoras (BARROS *et al.*, 2005). Além do boro, costuma-se empregar os seguintes elementos químicos como dopantes: nitrogênio, fósforo e lítio (BARROS *et al.*, 2005).

Após o crescimento dos filmes de DDB, o contato elétrico de natureza ôhmica entre metal e semicondutor (com resistência mínima) e o isolamento de todas as partes do eletrodo são etapas indispensáveis à montagem do eletrodo (BARROS *et al.*, 2005).

As técnicas analíticas comumente utilizadas para caracterizar as alterações morfológicas, químicas, ópticas, bem como as propriedades eletrônicas de filmes



finos de diamante são: microscopia de força atômica (avaliar a morfologia superficial), microscopia de varredura por tunelamento (avaliar a morfologia superficial dos filmes em escala atômica), espectroscopia Raman (investiga a microestrutura dos filmes, identificando a presença de ligações sp^2 em seu interior), difração de raios X (investigar a orientação cristalina, composição e estrutura dos filmes) e espectrometria de massa de íon secundário (permite a determinação quantitativa do agente dopante e sua distribuição espacial na região próxima à superfície dos filmes), (BARROS *et al.*, 2005; XU *et al.*, 1997; PECKOVÁ, MUSILOVÁ e BAREK, 2009).

A partir dos anos 90, alguns parâmetros foram considerados vislumbrando a construção de sensores para fins de eletroanálise, considerando a técnica de crescimento de filmes de diamante por HF-CVD (ALFARO *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2005; PATEL, HASHIMOTO e FUJISHIMA, 1992). Desde então, sensibilidade, seletividade e, fundamentalmente estabilidade têm direcionado grande atenção às aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas de eletrodos de DDB. Tal interesse tem por fundamento as excelentes propriedades destes materiais (MEDEIROS *et al.*, 2008; PEDROSA, CODOGNOTO e AVACA, 2003; PECKOVÁ, MUSILOVÁ e BAREK, 2009; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2004):

- ✦ baixa e estável corrente de fundo;
- ✦ extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas (por exemplo, 180 °C);
- ✦ ampla janela de potencial em meio aquoso e não-aquoso podendo ser maior que 3,5 V (o desprendimento de hidrogênio e oxigênio começam em -1,5 V e +2,5 V (vs. $E_{Ag/AgCl}$), respectivamente);
- ✦ estabilidade eletroquímica de resposta em longo prazo em meios ácidos e alcalinos;
- ✦ inércia química;
- ✦ elevada estabilidade química e mecânica, além da alta resistência à corrosão em meios agressivos;
- ✦ superiores propriedades físicas e eletrônicas, além de alta condutividade térmica e elétrica (dependente do nível de dopagem);
- ✦ alta densidade de corrente e baixa capacitância;



- ✦ fraca adsorção de moléculas polares em superfícies com terminações em oxigênio e em hidrogênio, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento (resistência à passivação), que é de importância considerável em eletroanalítica, resultando em boa resposta redox para muitos analitos em soluções aquosas e não-aquosas sem pré-tratamento convencional.

Além das características apresentadas, o uso do DDB em eletroanálise é dependente da concentração do dopante, dos defeitos estruturais no filme de diamante, do teor de impurezas do carbono sp^2 , das orientações cristalográficas e, sobretudo, das terminações superficiais em hidrogênio e oxigênio (MATSUSHIMA *et al.*, 2012). Estas últimas são as que mais influenciam a resposta eletroquímica dos eletrodos de DDB, pois alteram as propriedades físicas, químicas e eletrônicas do sensor (OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2010). Se por um lado o eletrodo constituído por terminações superficiais de hidrogênio apresenta caráter hidrofóbico, afinidade eletrônica negativa e alta condutividade, por outro, as terminações superficiais em oxigênio possuem natureza hidrofílica, apresenta afinidade eletrônica positiva e tem baixa condutividade (OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2010).

Evidências experimentais têm demonstrado que polarizações anódicas e/ou catódicas podem conferir mudanças superficiais no DDB (OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2010), mostrando-se sensível à presença de compostos orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes em concentrações em nível de traços. A escolha do pré-tratamento deve levar em consideração as características em termos de carga superficial gerada no eletrodo frente à afinidade pelo analito. Assim, as terminações superficiais do DDB são normalmente geradas por métodos eletroquímicos, em que (ALFARO *et al.*, 2006; OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2010; POLCARO *et al.*, 2004; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006):

- ✦ as terminações em hidrogênio são geradas por meio de polarizações catódicas (redução da água) promovendo a evolução de hidrogênio. Uma densidade de carga superficial positiva é formada na superfície do DDB, tendendo a repelir as espécies eletroativas, que no meio



tampão e pH de estudo, apresentam caráter mais positivo; e atrair caso tenham caráter negativo;

- ✦ as terminações em oxigênio são geradas por meio de polarizações anódicas (oxidação da água) promovendo a evolução de oxigênio. Uma densidade de carga superficial negativa é formada na superfície do DDB, devido a um excesso de oxigênio superficial existente, tendendo a repelir as espécies eletroativas, que no meio tampão e pH de estudo, apresentam caráter mais negativo; e atrair caso tenham caráter positivo;
- ✦ as terminações em hidrogênio ou oxigênio são formadas por tratamento com plasma de oxigênio (oxigênio, hidrogênio, flúor etc.) ou por meio de uma solução de um ácido forte em ebulição (FERRO e DE BATTISTI, 2000; YAGI *et al.*, 1999).

Embora na literatura haja muitos trabalhos que utilizam o tratamento anódico para a polarização do eletrodo de DDB, Suffredini *et al.*, (2004), brasileiros, chamaram a atenção para o efeito causado pelo pré-tratamento eletroquímico catódico sobre a resposta eletroquímica do eletrodo de DDB. O pensamento destes autores é confirmado por meio dos estudos de VC, VPD e espectroscopia de impedância eletroquímica realizados por Oliveira e Oliveira-Brett (2010). Os autores demonstram a superioridade do DDB após tratamento catódico frente à polarização anódica. Eles acrescentam que a interação e adsorção das espécies eletroativas na superfície do DDB polarizado catodicamente é facilitada pela maior condutividade do DDB (maior velocidade de transferência de carga). O DDB pré-tratado anodicamente é influenciado pela adsorção de radicais hidroxilas durante o tratamento, logo a superfície não se encontra completamente inerte.

Diante disto, listam-se abaixo algumas aplicações recentes usando eletrodos de DDB:

- ✦ Codognoto, Machado e Avaca (2002) desenvolveram um método voltamétrico para determinar pentaclorofenóis usando VOQ e um eletrodo de DDB polarizado catodicamente (-3 V por 30s) para remover



a película hidrofóbica que recobre a superfície. Limites de detecção de $5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $15,5 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos para eletrólito puro e amostras de água contaminadas, respectivamente. Níveis de recuperação de 100 % foram diagnosticados.

- ✦ [Zhang e Oyama \(2004\)](#) estudaram a eletroanálise da mioglobina e hemoglobina com um eletrodo de DDB. Voltamogramas cíclicos mostraram uma relação linear correspondente a uma década de concentração (10^{-6} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) para as duas moléculas orgânicas investigadas.
- ✦ [Sartori et al., \(2009\)](#) determinaram ácido acetilsalicílico em formulações comerciais usando um eletrodo de DDB e VOQ, alcançando um LD de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.
- ✦ [Santos et al., \(2010\)](#) desenvolveram um método voltamétrico por onda quadrada para determinação do hormônio estriol usando um eletrodo de DDB. LD da ordem de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e recuperações entre 98,6 – 101% foram determinados para amostras farmacêuticas e de urina.
- ✦ Além desses estudos, destacamos na literatura aplicações do eletrodo de DDB para determinação de antioxidantes em alimentos ([MEDEIROS, ROCHA-FILHO e FATIBELLO-FILHO, 2010](#)), de sulfametoxazole e trimetoprim em formulações farmacêuticas ([ANDRADE et al., 2010](#)), de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas ([LOURENÇÃO et al., 2009](#)), de aspartame e ciclamato ([ANDRADE et al., 2008](#)), da degradação de pentaclorofenol assistida por ultrassom ([GARBELLINI, SALAZAR-BANDA e AVACA, 2010](#)), de pesticidas em vegetais e frutas ([GARBELLINI, SALAZAR-BANDA e AVACA, 2009](#)), da lidocaína em fármacos ([OLIVEIRA et al., 2007](#)), entre outros.



EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3



3 EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As medidas de pH foram obtidas em um medidor de pH 713 da Metrohm. A homogeneização das soluções foi conduzida em um banho-ultrassom USC 1400 da Ultrasonic Cleaner. As medições voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Eco Chemie, μ Autolab[®] Tipo II, funcionando no modo potenciostático, acoplado a um microcomputador **Figuras 3.1A e 3.1B**.

Utilizou-se uma célula eletroquímica equipada com três eletrodos (**Figura 3.1B**): um eletrodo de referência Ag/AgCl – KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), um fio de platina como eletrodo auxiliar e como eletrodo de trabalho, empregou-se um eletrodo de CV Metrohm, 2 mm de diâmetro, o qual era polido mecanicamente sob um papel de filtro umedecido com spray de grão de diamante ($1 \text{ }\mu\text{m}$) da Kemet International Ltda, UK. Esporadicamente, de forma alternativa um polimento em um feltro com spray de diamante foi realizado em uma lixadeira politriz AROPOL – 2,0 V com uma velocidade 300 rpm por cerca de 2 min. Após o polimento, o eletrodo era lavado abundantemente com um forte jato de água sobre sua superfície.

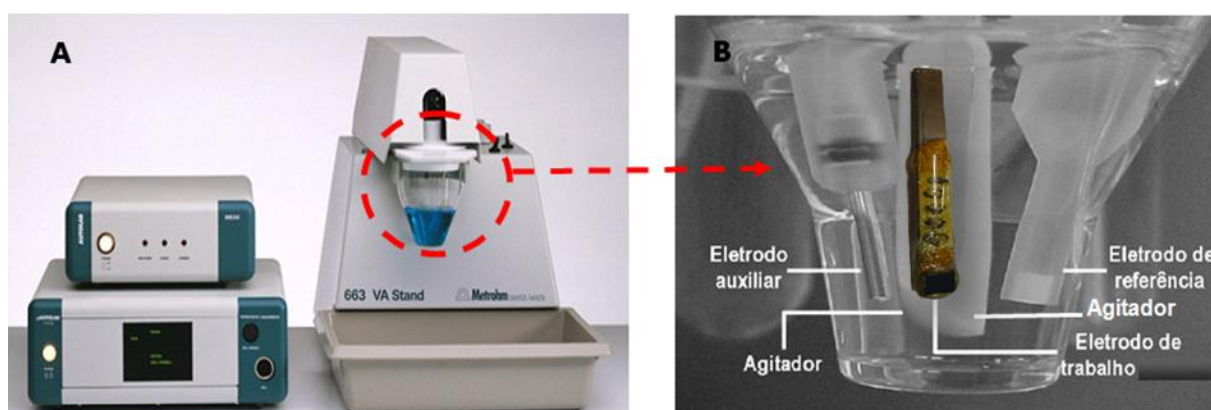


Figura 3.1– A) Potenciostato Eco Chemie, à esquerda, e o módulo polarográfico à direita. B) Célula eletroquímica e disposição dos eletrodos.

O comportamento eletroquímico da RCA 60 também foi investigado sob os seguintes eletrodos de trabalho: Au, Pt, PC (70% pó de grafite e 30% aglutinante) e DDB (8.000 ppm) com área geométrica $0,36 \text{ cm}^2$ (**Figura 3.2**).



O eletrodo de DDB foi produzido pelo Centro Suíço de Eletrônica e Microtécnica (CSEM), Neuchâtel, Suíça, e sintetizado sobre um substrato de silício pela técnica por filamento quente HF-CVD (*Hot Filament Chemical Vapor Deposition*), com temperatura entre 2.440 e 2.560 °C, cuja fase gasosa consistia em metano, com excesso de hidrogênio e trimetilboro como gás de dopagem. O contato elétrico foi estabelecido entre o filme de DDB e uma placa de cobre usando liga estanho/chumbo (soldagem), sendo o filme isolado com resina epóxi Araldite®.



Figura 3.2– Eletrodo de DDB: (1) filme de DDB; (2) contato elétrico (liga estanho/chumbo); (3) isolamento do contato elétrico com resina epóxi Araldite® e (4) placa de cobre.

3.2 Soluções e reagentes

Todos os reagentes foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada ($\text{Milli-Q Plus } 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Os reagentes para preparo das soluções tampão são de pureza analítica, adquiridas da Sigma-Aldrich. Uma solução estoque de RCA 60, obtida independentemente da cultivar de mamoneira extraída conforme seção 3.3, foi preparada na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e guardada sob refrigeração. Diluições subsequentes foram realizadas conforme a sensibilidade da técnica voltamétrica empregada. Um padrão analítico da cadeia A da RCA 60 (RCA-A 30, $1,03 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína em um solução 40% glicerol contendo 10 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 6,0), $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, 10 mmol L^{-1} de galactose e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ditioeritritol), cujas diluições foram realizadas diretamente na célula eletroquímica. Ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizado como eletrólito suporte em pH 1,0. Na **Tabela 3.1** estão mostradas as composições das soluções tampão usadas como eletrólito de suporte.



Tabela 3.1– Soluções Tampão para eletrólitos de suporte com diluição para 100 mL de água (adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007).

pH	Composição (mL)	Força iônica
2,2	HCl 0,2 mol L ⁻¹ (25,0) + KCl 0,2 mol L ⁻¹ (6,5)	0,063
3,6	HAcO 0,2 mol L ⁻¹ (3,7) + NaAcO 0,2 mol L ⁻¹ (46,3)	0,100
4,3	HAcO 0,2 mol L ⁻¹ (13,2)+ NaAcO 0,2 mol L ⁻¹ (36,8)	0,197
5,4	HAcO 0,2 mol L ⁻¹ (41,2) + NaAcO 0,2 mol L ⁻¹ (8,8)	0,100
6,0	NaH ₂ PO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (6,15) + Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (43,85)	0,125
7,0	NaH ₂ PO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (30,5) + Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (19,5)	0,222
8,0	NaH ₂ PO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (47,35) + Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ (2,65)	0,289
9,0	Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O 0,025 mol L ⁻¹ (50,0) + NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (3,0)	0,040
10,2	Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O 0,025 mol L ⁻¹ (50,0) + NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (22,7)	0,060
11,8	KCl 0,2 mol L ⁻¹ (25,0) + NaOH 0,2 mol L ⁻¹ (6,0)	0,062

3.3 Extração da RCA 60

As amostras de RCA 60 ($\approx 90\%$) foram extraídas de três cultivares distintas de mamoneira (BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Energia) as quais foram cedidas pela EMBRAPA Algodão-PB. O procedimento de extração da RCA 60 envolveu as seguintes etapas, ilustradas na **Figura 3.3**: a) maceração do endosperma da semente (equipamento usado: moinho analítico Quimis modelo 6298A21); b) remoção da fração lipídica misturando a massa da torta prensada (com teores significativos de lipídios totais) e hexano na proporção 1:3 (m/v) sob agitação automática por 12 h (equipamentos usados: mesa agitadora refrigeradora modelo Tecnal TE-424); c) mistura da massa e água na proporção 1:4 (m/v) e agitação por 30 min (equipamentos usados: vórtex modelo Phoenix AP 56); d) centrifugação por 15 min a 14000 rpm para obtenção do extrato bruto deslipidado de RCA 60, sobrenadante solúvel em água, (equipamentos usados: centrífuga centrifuge MCD 2000); e e) liofilização do extrato bruto magro (equipamento usado: liofilizador de bancada modelo Liotop L101).

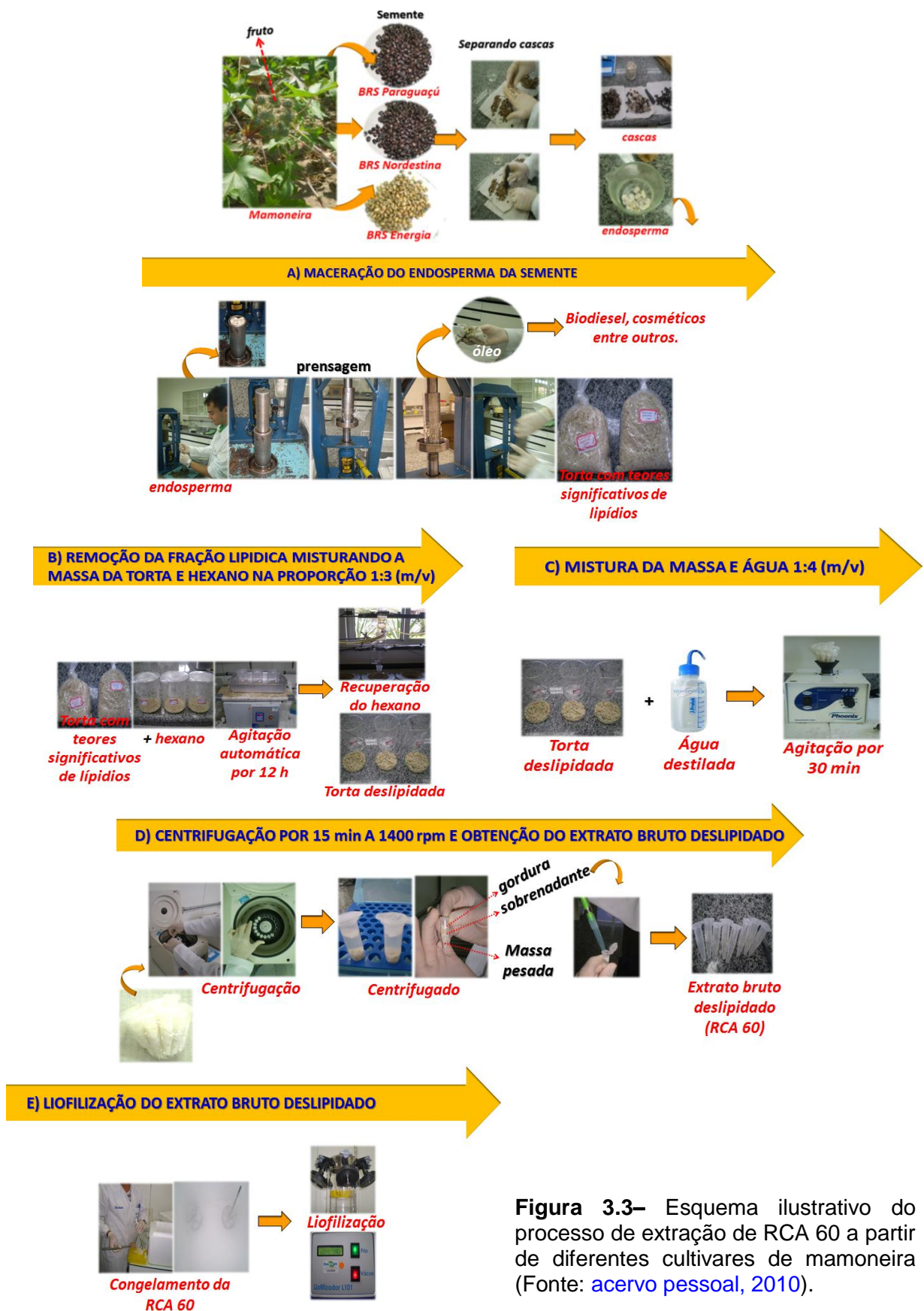


Figura 3.3– Esquema ilustrativo do processo de extração de RCA 60 a partir de diferentes cultivares de mamoneira (Fonte: acervo pessoal, 2010).



3.4 Pré-tratamento dos eletrodos de trabalho

Antes de cada medição eletroquímica, o CV sofria uma limpeza mecânica e eletroquímica. A limpeza mecânica consistia em submeter o CV a polimento mecânico diário com spray de grão de diamante, realizando-se movimentos em forma de oito ou circular, e lavado abundantemente com água deionizada. Em seguida, uma etapa de condicionamento eletroquímico foi empregada submetendo-se o CV a 20 varreduras cíclicas sucessivas no próprio eletrólito de suporte ou em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ numa janela de potencial de $-1,2$ a $1,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ com velocidade de varredura $1,0 \text{ V s}^{-1}$. A estabilidade da linha de base foi verificada na mesma janela de potencial empregando uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Para a etapa de caracterização eletroquímica do CV, voltamogramas cíclicos foram registrados em distintas velocidades de varredura, numa faixa de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $0,7 \text{ V}$, em uma solução de ferricianeto de potássio $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ usando KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) como eletrólito de suporte. Tal procedimento foi adotado para estimar a área eletroativa do CV. Procedimento similar foi usado para tratamento das superfícies eletródicas de ouro, platina e pasta de carbono, esta última diferindo apenas na etapa de limpeza mecânica, que era realizada em papel tipo manteiga.

Antes de cada medição, o DDB era submetido a dois procedimentos eletroquímicos em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Foi adotado o uso de uma polarização anódica para limpar a superfície do DDB (aplicação de um potencial de $+3,0 \text{ V}$ por 60 s) seguida de uma polarização catódica para ativar a sua superfície (aplicação de um potencial de $-3,0 \text{ V}$ por 120 s). Tal procedimento foi realizado em celas diferentes da cela de medida com o analito sob investigação, usando as técnicas cronopotenciometria e cronoamperometria ou as etapas de pré-tratamento disponível na janela de execução das técnicas VC, VOQ e VPD, estando à célula condicionada sem agitação durante a polarização, sendo a varredura de potencial interrompida antes que o voltamograma fosse registrado (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010).

O procedimento foi realizado diariamente antes do início das medidas voltamétricas, sendo repetido quando necessário, a fim de se obter resultados reprodutíveis e confiáveis, tendo em vista mudanças estruturais na superfície do



DDB decorrentes da perda de hidrogênio superficial causadas pela oxidação da superfície do DDB pelo oxigênio do ar.

A eficiência da polarização da superfície do DDB foi investigada mediante o registro de voltamogramas cíclicos para o sistema reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, usando uma solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.5 Testes de adsorção da RCA 60 no eletrodo de trabalho

Possíveis efeitos de adsorção da RCA 60 na superfície do eletrodo de trabalho foram verificados de acordo com os seguintes testes:

- ✦ em solução tampão: varreduras sucessivas foram realizadas em uma solução de RCA 60 sobre o eletrodo, que em seguida foi lavado com um jato de água deionizada e transferido para uma solução de eletrólito suporte puro e os voltamogramas foram registrados.
- ✦ adsorção livre: voltamogramas dos sinais dos brancos foram registrados e em seguida o eletrodo foi imerso em uma solução de RCA 60 por 10 min (sem agitação). Posteriormente o eletrodo foi lavado com um jato de água deionizada e transferido para uma nova solução eletrolítica para registro dos voltamogramas.

3.6 Procedimentos experimentais

As medições voltamétricas de oxidação foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) em eletrólito de suporte não deaerado, exceto para o registro dos voltamogramas de redução. Sistematizou-se o uso de duas células eletroquímicas: uma para o eletrólito de suporte (branco) e outra para eletrólito de suporte + alíquota de RCA 60.

3.6.1 Investigações eletroquímicas

Parâmetros experimentais utilizados nas investigações eletroquímicas:



- ✦ VC: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$;
- ✦ VPD: $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$;
- ✦ VOQ: $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

Além disso, a influência do pH foi analisada numa faixa de 2,2 a 11,8, empregando as soluções apresentadas na **Tabela 3.1** como eletrólito de suporte. Varreduras anódicas e catódicas foram aplicadas entre $E_i = 0 \text{ V}$ e $E_\lambda = +1,4 \text{ V}$ e $E_i = 0 \text{ V}$ e $E_\lambda = -1,0 \text{ V}$, respectivamente, vs. Ag/AgCl.

3.6.2 Método voltamétrico para determinação de RCA 60

Estudos iniciais foram realizados com vista ao desenvolvimento de um método voltamétrico, empregando a técnica VOQ, para determinação de RCA 60 usando um eletrodo de CV, obtida a partir de extratos da torta de mamona de diferentes cultivares. As limitações encontradas ao longo das etapas experimentais justificaram a utilização do eletrodo de DDB. Para a etapa de otimização dos parâmetros voltamétricos e construção da curva analítica utilizou-se um padrão analítico correspondente à RCA-A 30.

3.6.2.1 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada foram registrados em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) sobre DDB, usando preliminarmente os parâmetros instrumentais apresentados na seção 3.6.1 para otimização do sistema voltamétrico de forma univariada. Foi também investigada a influência do pH sobre a resposta Voltamétrica da RCA-A 30 em uma faixa de 1,0 a 11,8.

Os voltamogramas de pulso diferencial e alguns de onda quadrada foram suavizados usando a função *Savitzky and Golay smooth* nível 4 ou 2, dependendo do nível de ruído do sinal analítico, e a linha de base corrigida com a função *moving average* empregando uma janela de potencial de 2 mV ou ajustada aos dados obtidos, ambas disponíveis no *software* GPES versão 4.9. Esse tratamento foi usado para uma melhor identificação e apresentação dos picos de oxidação da RCA 60.



Para os cálculos das curvas analíticas foram empregados os dados brutos dos voltamogramas. Além desse software, também foi utilizado o Origin[®] 5.0 para tratamento dos dados.

3.7 Variáveis de desempenho analítico

Sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), curva analítica, linearidade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão (teste de recuperação), são parâmetros essenciais à validação de métodos analíticos (BURNS, DANZER e TOWNSHED, 2001; BRITO *et al.*, 2003; MOCAK *et al.*, 1997).

A sensibilidade da metodologia foi avaliada pelo cálculo do LD e LQ, conforme **Equações 3.1** e **3.2**, respectivamente (MOCAK *et al.*, 1997; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad \text{Eq. 3.2}$$

S_b é o desvio-padrão da média do sinal do branco em eletrólito puro e b a sensibilidade da curva analítica, ou seja, o coeficiente angular em um nível de significância de 95% de confiança.

A exatidão foi avaliada como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico. Neste sentido, a exatidão da metodologia foi avaliada pelo nível de recuperação (BURNS, DANZER e TOWNSHED, 2001) obtido para a RCA-A 30 em uma amostra de RCA 60 presente no extrato deslipidado extraído da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu, conforme seção 3.3. A amostra foi preparada em uma solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, diluída para um valor de concentração contido na curva analítica. Três adições de um padrão analítico de concentração conhecida da RCA-A 30 ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionadas na célula eletroquímica, a um volume de amostra 3 mL. Os voltamogramas foram registrados nas condições ótimas de análise. A relação entre



o coeficiente linear (A) e o coeficiente angular (B) da reta obtida ($y = 0$), possibilitou obter a concentração recuperada, a partir da amostra analisada.

Para uma adicional verificação da exatidão do método desenvolvido e da interferência da matriz, foram calculados os valores de recuperação da RCA-A 30 para uma alíquota de 10 μL ($3,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) do padrão analítico da RCA-A 30 em relação ao sinal da amostra de RCA 60 BRS Paraguaçu. A taxa de recuperação (%R) foi calculada pela relação percentual entre as quantidades de RCA-A 30 recuperadas e adicionadas, esta foi estimada através da **Equação 3.3** e um esquema ilustrativo do procedimento experimental está apresentado na **Figura 3.4**. A relação A/B é obtida da curva obtida com as adições de padrão da RCA-A 30.

$$\%R = \frac{\left(\frac{A}{B}\right)_{\text{obtida}} - [RCA - A 30]_{\text{real}}}{[RCA - A 30]_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad \text{Eq. 3.3}$$

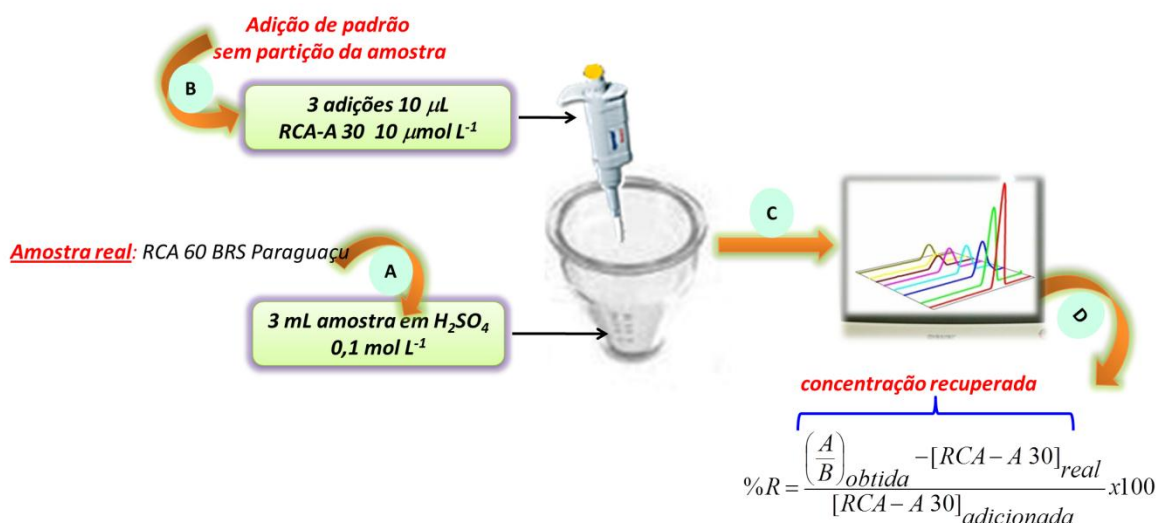


Figura 3.4– Esquema ilustrativo para o procedimento de recuperação baseado no método de adição de padrão.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 4



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os estudos eletroquímicos apresentados a seguir foi empregada a RCA 60 (extrato bruto deslipidado) extraída da cultivar BRS Paraguaçu, sendo registrados também voltamogramas comparativos em VOQ para as demais espécies. Em adição, qualquer que seja a análise, deve ser vista como o resultado médio da participação de alguns dos 17 aminoácidos das cadeias A e B. Os voltamogramas referem-se à primeira varredura de potencial, salvo tenha outra indicação.

4.1 Comportamento eletroquímico da RCA 60 em diferentes eletrodos de trabalho

Os voltamogramas de onda quadrada observados na **Figura 4.1**, confirmam a eletroatividade da RCA 60 em uma solução recém-preparada de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, usando os seguintes eletrodos de trabalho: ouro ($\phi=2 \text{ mm}$), carbono vítreo ($\phi=2 \text{ mm}$), pasta de carbono ($\phi=3 \text{ mm}$) e platina ($\phi=2 \text{ mm}$).

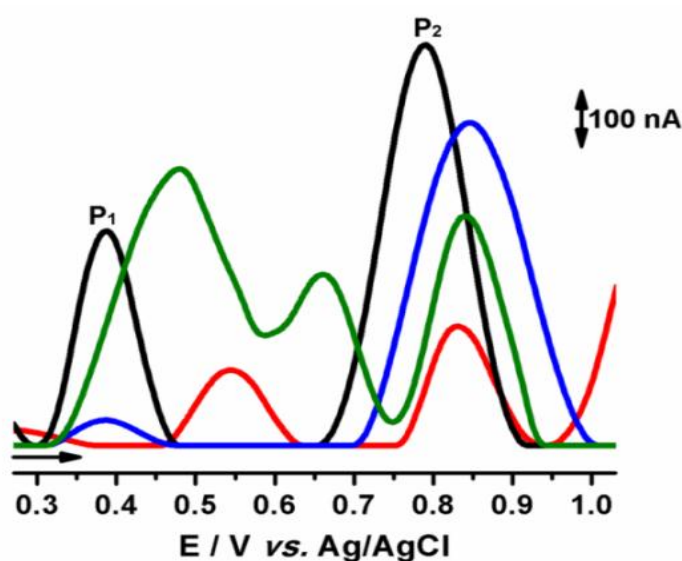


Figura 4.1– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ registrados em diferentes eletrodos de trabalho em solução tampão fosfato (pH 7,0): (—) CV; (—) EAu; (—) EPC e (—) EPt. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

Os diferentes eletrodos testados apresentam variabilidade considerável para corrente de fundo, sendo os eletrodos CV e PC melhores com relação a esse parâmetro.



Dois processos de oxidação eletroquímica foram identificados por meio dos picos $P_1 \approx + 0,45 \text{ V}$ e $P_2 \approx + 0,83 \text{ V}$ e iniciam-se na mesma região de potenciais para todos os eletrodos testados, exceto para o eletrodo de ouro. Os processos identificados possuem centros eletroativos que possivelmente advêm dos AA constituintes da molécula da RCA 60.

Apenas o voltamograma registrado em platina revelou a existência de um terceiro pico, situado entre os picos P_1 e P_2 , correspondente à eletroatividade do eletrólito de suporte. Ressalta-se ainda, que o fato da oxidação eletroquímica da RCA 60 ocorrer na região de potenciais que favorecem a formação dos óxidos de platina e ouro (TOLEDO *et al.*, 2005), isto dificulta a análise da reação de oxidação da RCA 60, inviabilizando, assim, o uso do ouro ou platina para estudos analíticos posteriores.

Apesar da complexidade da amostra e da molécula de RCA 60, tais resultados presumem o desenvolvimento de um método voltamétrico para análise da RCA 60 em amostras de extratos de sementes ou produtos processados, tais como, torta, farelo, entre outros. Recomenda-se assim, o uso de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, por conciliar um melhor perfil voltamétrico e atender uma boa condição de compromisso entre sensibilidade e seletividade analítica.

4.2 Comportamento eletroquímico da RCA 60

4.2.1 Voltametria cíclica

Devido à complexidade da molécula de RCA 60 e a limitação da quantidade e da concentração da RCA 60 disponível para estudo, os voltamogramas cíclicos registrados não evidenciam nenhum sinal analítico na faixa de potenciais negativos, 0 a $-1,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, sobre o eletrodo CV. Portanto, os estudos foram repetidos considerando apenas a região de potenciais positivos. Na varredura direta de potencial, dois processos de oxidação foram observados, **Figura 4.2**, em $P_1 \approx + 0,42 \text{ V}$ e $P_2 \approx + 0,82 \text{ V}$.

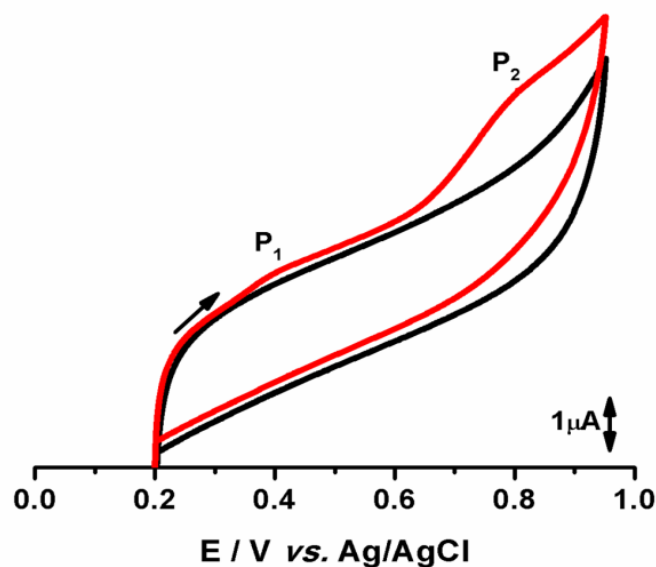


Figura 4.2– Voltamogramas cíclicos de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) na ausência e (—) presença de RCA 60. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Ao mudar o sentido da varredura nenhum pico correspondente à redução dos produtos de oxidação formados na superfície do CV foi observado, podendo ser um indicativo de processo irreversível.

Por ser uma substância de toxicidade elevada não foi possível trabalhar em níveis de concentração mais elevados. Assim, a intensidade dos sinais observados por VC limitam-se devido à concentração de RCA 60 e à baixa sensibilidade da técnica. Tal efeito dificultou a caracterização da reversibilidade dos processos redox, bem como a observação de possíveis produtos de oxidação. Um diagnóstico mais preciso será dado ao analisar os voltamogramas de onda quadrada apresentados na seção 4.2.3.

A supressão dos picos P_1 e P_2 observados nas varreduras sucessivas de potencial, **Figura 4.3**, podem estar associados a processos de adsorção de RCA 60 e/ou seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho) na superfície do CV, reduzindo a área superficial ativa do eletrodo (passivação do CV), corroborando com a perda de sinal de corrente decorrente das varreduras sucessivas. Porém, investigações detalhadas são necessárias para obtenção de resultados conclusivos.

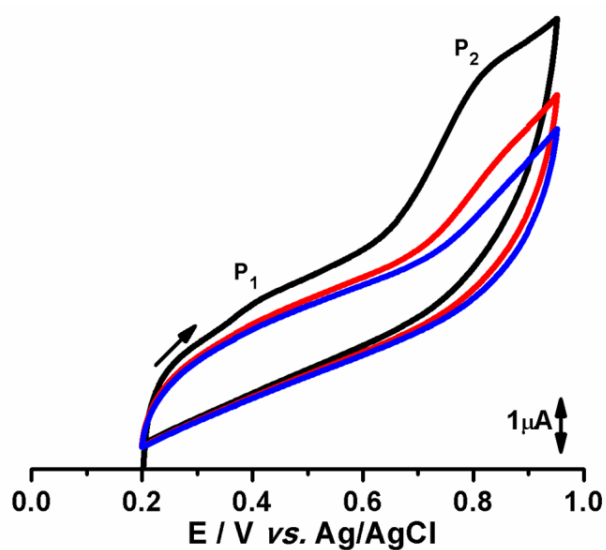


Figura 4.3– Voltamogramas cíclicos de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A fim de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do CV, experimentos de VC foram realizados em diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75 e 150 mV s^{-1}). O estudo foi inicialmente realizado sem polimento entre as medidas, sendo observada perda drástica da resposta do CV a partir da velocidade 25 mV s^{-1} . Tal comportamento pode estar associado à adsorção de RCA 60 e/ou seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho), que bloqueiam a superfície do CV. Alternativamente, os estudos foram repetidos usando um polimento para o CV entre cada medida, **Figura 4.4A**.

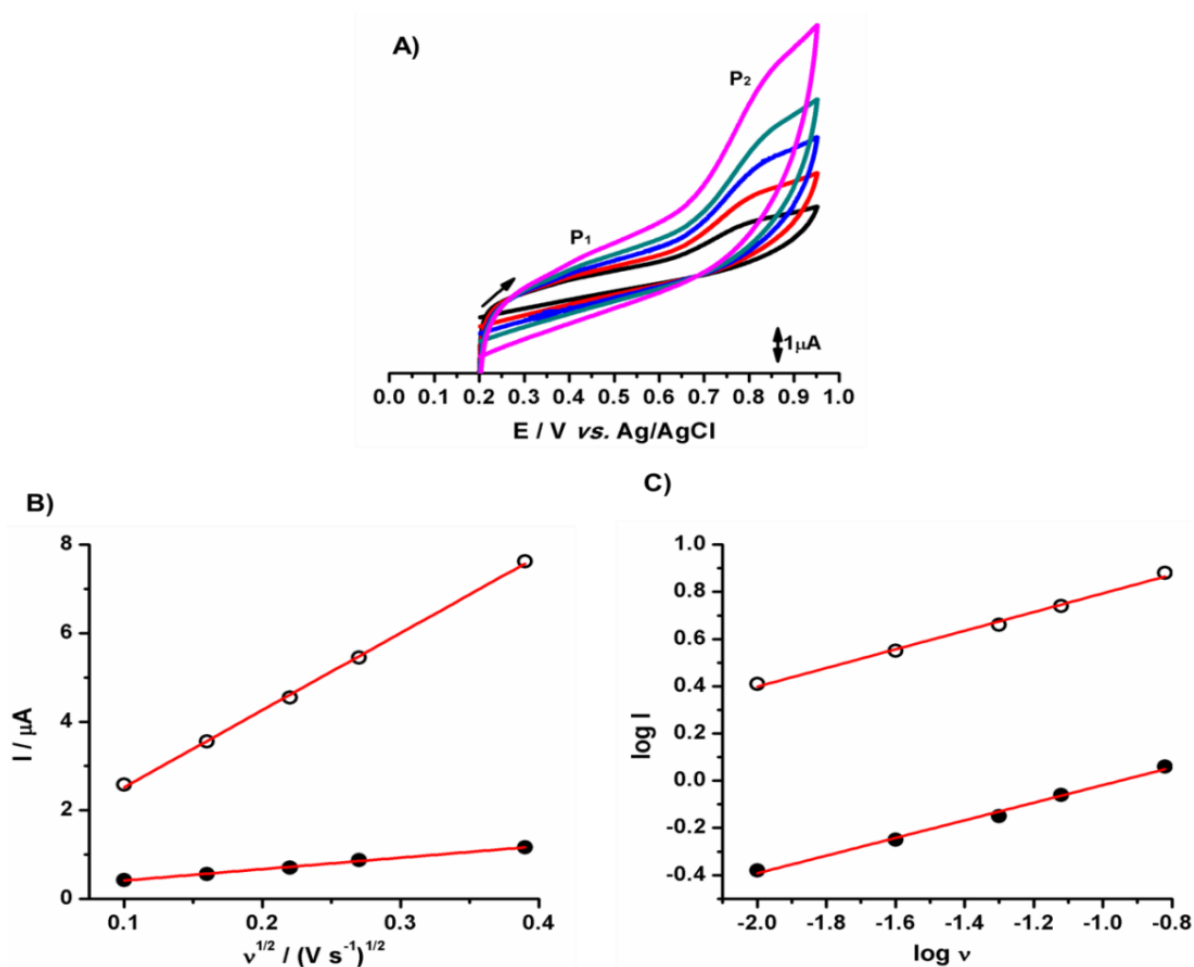


Figura 4.4– Voltamogramas cíclicos de uma solução 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV em diferentes velocidades de varredura. A) (—) 10, (—) 25; (—) 50; (—) 75 e (—) 150 mV s^{-1} . B) Relação do I_p com a $v^{1/2}$: (●) P₁, (○) P₂. C) Relação do $\log I_p$ com o $\log v$: (●) P₁, (○) P₂.

Uma vez que a dependência linear da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura obedece à equação $I_p = kv^x$, valores de x iguais a 1,0 e 0,5 são esperados para processos de eletrodo governados por adsorção e difusão, respectivamente (GOSSER Jr., 1993¹⁴ citado por ERK, 2003). Na **Figura 4.4B** está mostrada a relação linear da I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Logo é possível afirmar que o processo de oxidação da RCA 60 tanto para P₁ quanto para P₂ é controlado por difusão. Em adição, os gráficos de

¹⁴ GOSSER Jr., D. K.; **Cyclic Voltammetry**: Simulations and analysis of a reaction mechanisms. New York: Wiley-VHC, 1993.



$\log I_p$ vs. $\log v$, **Figura 4.4C**, evidenciam valores de coeficientes angulares iguais a 0,37 e 0,40 para os picos P_1 e P_2 , respectivamente, confirmando a natureza do transporte de massa, que segundo a literatura é igual a 0,50 para processos difusionais e aproxima-se de 1,0 para processos controlados por adsorção (GOSSER Jr., 1993).

Considerando apenas o pico P_2 , **Figura 4.4B**, o módulo da diferença entre o potencial de pico e o potencial de meia altura de pico ($|E_{p2} - E_{p2/2}|$) encontrado foi igual a 72,2 mV. Uma vez que, para um sistema irreversível controlado por difusão a equação é $|E_{pa} - E_{p/2}| = 47,7 \text{ mV}/(\alpha n_a)$, onde α é o coeficiente de transferência de carga anódica e n_a o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade (BRETT e BRETT, 1996), o valor de $\alpha n_a = 0,66$ foi determinado. A relação linear entre a corrente de pico (I_p) vs. $v^{1/2}$ obedece à **Equação (4.1)**:

$$I_p(A) = 0,77 \times 10^{-6} + 17,4 \times 10^{-6} v^{1/2} (Vs^{-1})^{1/2} \quad \text{Eq. 4.1}$$

A equação acima pode ser confrontada com a equação de Randles-Sevcik, **Equação 4.2**, definida para sistemas irreversíveis ou quase-reversíveis em que o transporte de massa é governado por difusão (BARD e FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

$$I_p(A) = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C_{RCA\ 60} D_{RCA\ 60}^{1/2} v^{1/2} (Vs^{-1})^{1/2} \quad \text{Eq. 4.2}$$

onde: n é o número de elétrons transferidos durante a oxidação da RCA 60 ($n = 1e^-$) determinado por VPD (seção 4.2.2); α é o coeficiente de transferência de carga; n_a é o número de elétrons envolvido no passo de transferência de carga ($\alpha n_a = 0,66$); $D_{RCA\ 60}$ é o coeficiente difusional da RCA 60 em $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$; A é a área eletroativa do CV em cm^2 determinada pela equação de Randles-Sevcik para o sistema totalmente reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, utilizando uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,0 mmol L^{-1} e KCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito de suporte ($D_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; HEGDE, HOSAMANI e NANDIBEWOOR, 2009) estimada em $3,57 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{RCA\ 60}$ é a concentração em mol cm^{-3} (equivalente a $200 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-3}$) e v em V s^{-1} . Como a relação linear I_p vs. $v^{1/2}$ possui uma inclinação de $17,4 \times 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1}$, logo o valor do coeficiente difusional da RCA 60 em solução tampão fosfato pH 7,0 foi estimado, $D_{RCA\ 60} = 1,02 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.



4.2.2 Voltametria de pulso diferencial

Os voltamogramas de pulso diferencial correspondentes à primeira varredura de potencial, **Figura 4.5A**, e segunda varredura de potencial, **Figura 4.5B**, foram todos registrados em soluções de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 em diferentes eletrólitos (**Tabela 3.1**) e o efeito do pH foi investigado em uma faixa de 2,2 a 11,8, sucessivamente.

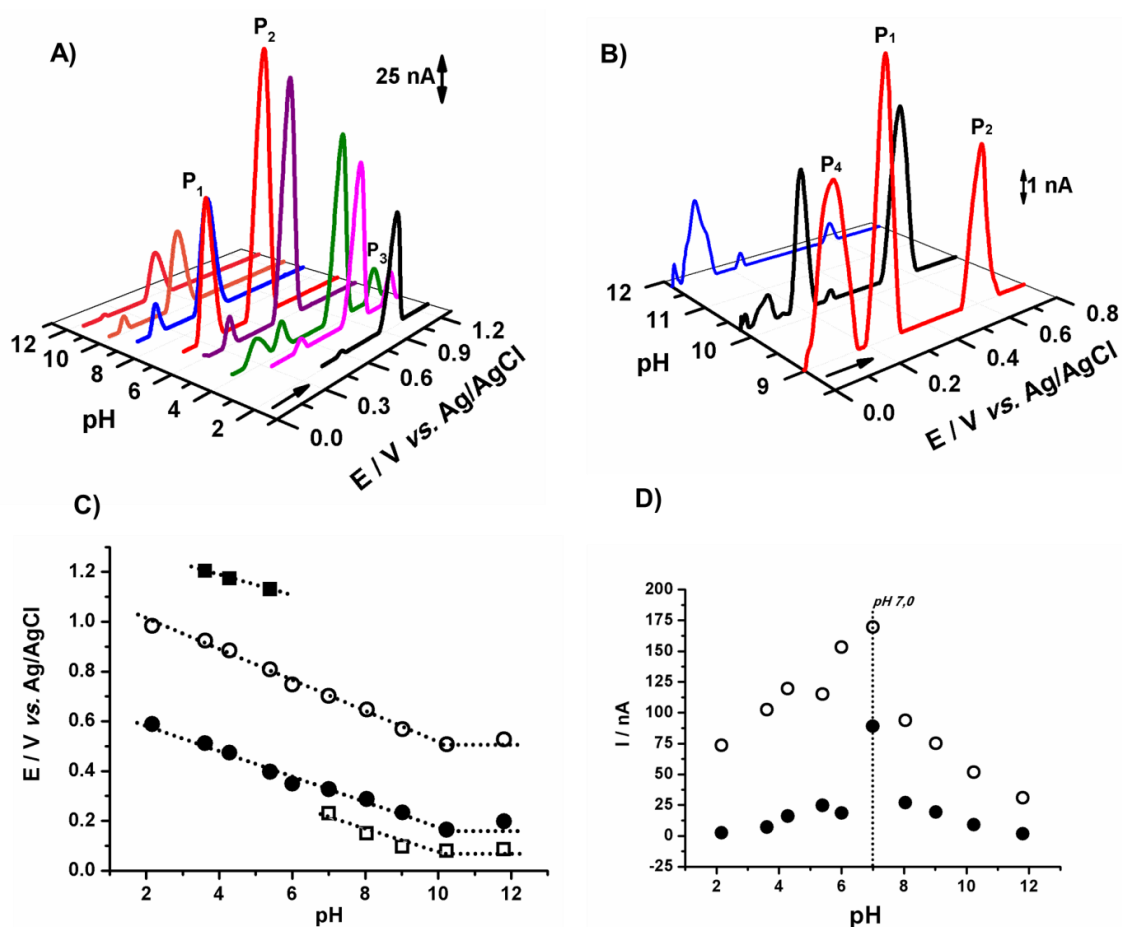


Figura 4.5– Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da A) 1ª e B) 2ª varredura sobre CV obtidos em solução de RCA 60 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos em função do pH. C) Relação do E_p com o pH na 1ª varredura: (●) P_1 , (○) P_2 , (■) P_3 e (□) P_4 – 2ª varredura. D) Relação da I_p com o pH na 1ª varredura: (●) P_1 e (○) P_2 . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Para valores de $2,2 \leq \text{pH} \leq 10,2$, os potenciais de pico P_1 e P_2 exibem uma dependência linear com o pH e deslocam-se para valores mais negativos com o aumento do pH. A relação entre (E vs. pH), **Figura 4.5C**, é linear e apresenta uma



inclinação de $-52,0$ mV/pH para o pico P_1 e $-61,0$ mV/pH para o pico P_2 , indicando um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons para ambos processos (SMITH, 2006).

Levando-se em consideração que a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) a um nível de confiança de 95% é igual a $57,3 \pm 20,5$ mV para o P_1 e $104,6 \pm 24,8$ mV para o P_2 , o processo de oxidação envolve a transferência de 2 próton H^+ e $2e^-$ (P_1) e 1 próton H^+ e $1e^-$ (P_2). Os valores obtidos estão em concordância com o previsto teoricamente ao obedecer à relação $W_{1/2} = 90/n$, fornecendo valores de $W_{1/2}$ da ordem de 45 e 90 mV para reações eletroquímicas governadas pela transferência de 2 e 1 elétrons, respectivamente (BRETT e BRETT, 1996).

Para $pH \geq 10,2$, **Figura 4.5C**, ambos os picos independem do pH, indicando que nesta faixa de pH o mecanismo da reação envolveria apenas a transferência de $2e^-$ (P_1) e $1e^-$ (P_2), podendo seus produtos de oxidação apresentar desprotonação química em meio alcalino. Assim, um valor de pKa em torno de 10,2 foi determinado para os dois picos de oxidação da RCA 60.

Um terceiro pico de oxidação da RCA 60, **Figura 4.5A**, $P_3 = + 1,204$ V, somente foi identificado em pH ácido ($2,2 \leq pH \leq 5,4$) e diminuiu com o aumento do pH. A dependência do potencial de oxidação do pico P_3 com o pH é linear e obedece a relação $E_{,P_3}$ (V) = $1,350 (\pm 0,007) - 0,041 (\pm 0,002)$ pH, **Figura 4.5C**. A reta apresenta uma inclinação de $-41,0$ mV por unidade de pH, indicando um número de prótons que corresponde à metade do número de elétrons transferidos (GARRIDO *et al.*, 2010). Considerando o valor da largura de pico a meia altura, $W_{1/2} = 78,3 \pm 16,0$ mV (nível de confiança de 95%), P_3 pode envolver a transferência de $1e^-$ e 1 próton H^+ .

A segunda varredura de potencial, **Figura 4.5B**, revelou a existência de um quarto pico, $P_4 = + 0,091$ V, para valores de $7,0 \leq pH \leq 11,8$. Este pico corresponde à oxidação do produto da oxidação RCA 60, decorrente da contribuição dos picos P_1 e/ou P_2 . Observa-se uma dependência linear do potencial de pico para $7,0 \leq pH \leq 10,2$, com uma inclinação equivalente a $47,0$ mV/pH, mostrando que o processo eletroquímico é controlado pelo mesmo número de prótons e elétrons. Um valor de $W_{1/2} = 68,7 \pm 30,5$ mV (95% de confiança) revela que P_4 envolve a transferência de



$1e^-$ e 1 próton H^+ . Por outro lado, o potencial de pico praticamente não varia para valores de $10,2 \leq pH \leq 11,8$. Considerando o valor de $W_{1/2} = 64,7 \pm 38,8$ mV (95% de confiança) calculado, tem-se que o pico P_4 envolve a transferência de carga de $1e^-$, nesta faixa de pH. Assim, um valor de pKa em torno de 10,2 foi determinado para o produto de oxidação da RCA 60.

A **Figura 4.5D**, mostra a relação da corrente de pico para os picos P_1 e P_2 com o aumento do pH. Ambos os processos revelam que a corrente de pico aumenta para $2,2 \leq pH < 7,0$ e diminui para $7,0 < pH \leq 11,8$. Além disso, ambos apresentam picos máximos de corrente em tampão solução fosfato (pH 7,0), o que justifica a escolha deste meio como eletrólito de suporte para futuros estudos voltamétricos, por estabelecer condição de compromisso entre a sensibilidade e a resposta analítica.

4.2.3 Voltametria de onda quadrada

Concomitantemente à VC e VPD, experimentos usando VOQ foram executados em diferentes valores de pH, revelando comportamento eletroquímico concordante com os resultados discutidos por análise de VPD, um valor ótimo de pH 7,0 foi observado para estudos analíticos futuros.

No intuito de esclarecer a reversibilidade do processo redox, apresentado inicialmente através dos resultados inconclusivos registrados por VC, a varredura de potencial em VOQ produziu um voltamograma resultante, cuja separação das correntes obtidas nas varreduras direta e reversa constitui uma ferramenta de suma importância para diagnóstico do grau de reversibilidade do sistema.

Nas **Figuras 4.6A-D** estão mostradas a separação das correntes de pico onde é possível observar que a corrente resultante para os picos P_1 e P_2 , para a 1ª e 2ª varredura, em pH 7,0 e 9,0, advém da soma da contribuição das correntes das varreduras direta e reversa, cuja variação entre o potencial de pico catódico e anódico é maior que a razão $59/n$ (mV), valor típico para sistema totalmente reversíveis, confirmando a quase-reversibilidade do sistema, supostamente diagnosticada por VC como sendo irreversível. O perfil voltamétrico para a 2ª



varredura de potencial nos mesmos valores de pH investigados, revelam a existência do pico P_4 , diagnosticado por VPD anteriormente como produto decorrente dos processos de oxidação referentes aos picos P_1 e/ou P_2 da RCA 60. A assimetria observada para o pico P_4 entre as componentes direta e reversa indicam para um processo quase-reversível, **Figuras 4.6B e 4.6D**.

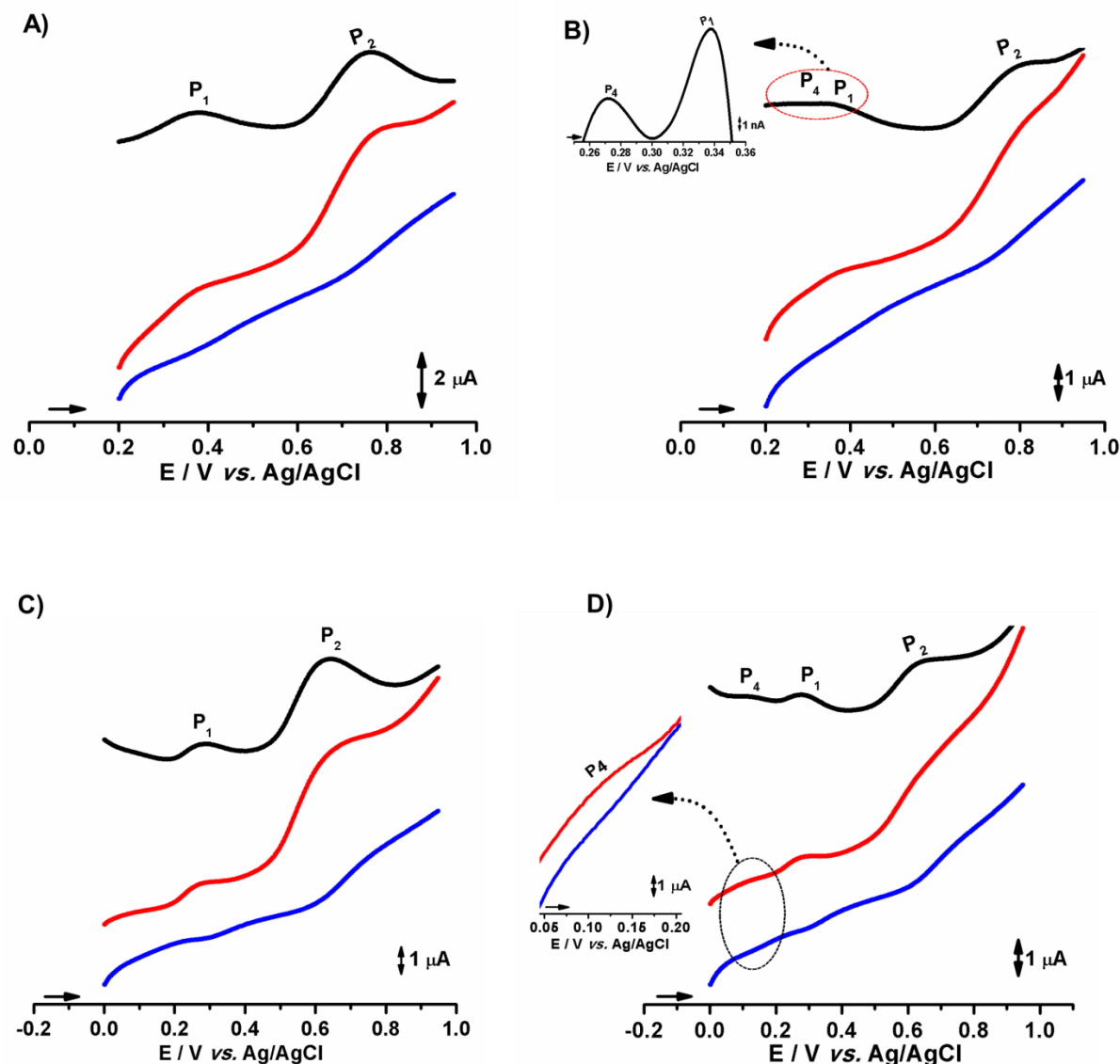


Figura 4.6– Voltamogramas de onda quadrada sobre o eletrodo CV de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 nas soluções tampão fosfato e tetraborato. A) pH 7,0 (1ª varredura): (—) corrente total (I_t), (—) corrente direta (I_d) e (—) corrente reversa (I_r). B) pH 7,0 (2ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . C) pH 9,0 (1ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . D) pH 9,0 (2ª varredura): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$.



Voltamogramas de onda quadrada foram registrados para uma solução de RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão borato pH 9,0 a fim de investigar a origem do pico P_4 . A varredura de potencial foi interrompida em 0,5 V e duas varreduras sucessivas não identificaram a existência de nenhum produto de oxidação decorrente do pico de oxidação P_1 da RCA 60, **Figura 4.7A**. Abrindo a janela de potencial até 0,9 V, **Figura 4.7B**, o registro de dois voltamogramas sucessivos confirma a existência de um produto de oxidação revelado pelo pico P_4 , estando esse diretamente associado à reação inerente ao pico de oxidação P_2 da RCA 60.

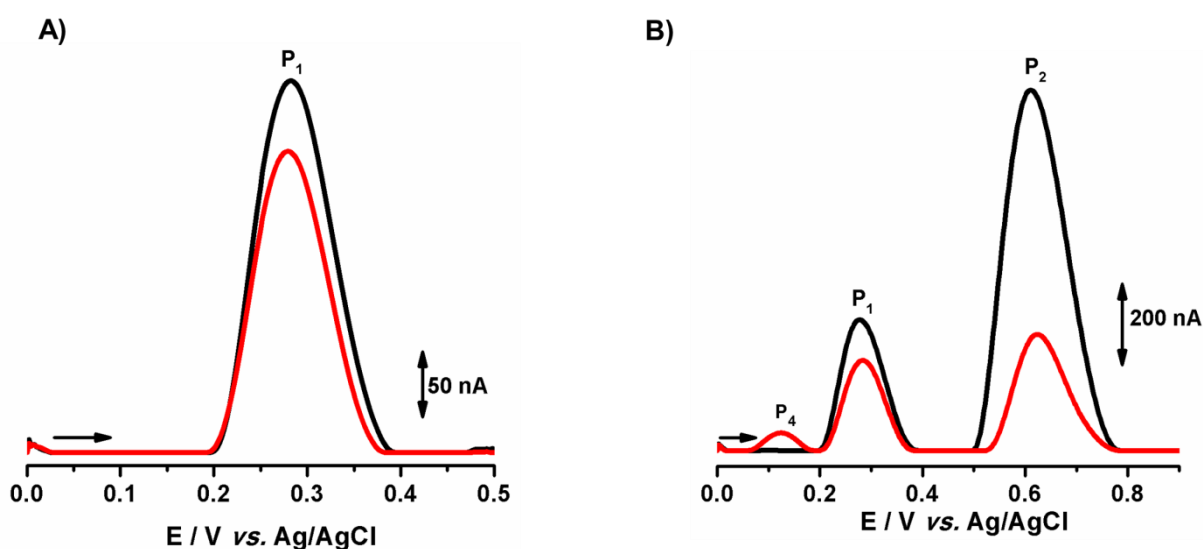


Figura 4.7– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida sobre CV obtidos em solução de RCA $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão borato pH 9,0: (A) 1^a (—) e 2^a (—) varredura fechando a janela de potencial em 0,5 V e (B) 1^a (—) e 2^a (—) varredura abrindo a janela de potencial até 0,9 V. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$.

Estudos de voltametria cíclica apresentados na seção 4.2.1 suscitaram provável efeito de adsorção decorrente da oxidação da RCA 60 e seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho). A fim de investigar este fenômeno, um teste de adsorção livre (seção 3.5) foi realizado mantendo o CV imerso em uma solução de RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 10 minutos, conduzido posteriormente a uma solução tampão fosfato pH 7,0 para o registro do voltamograma, o qual revelou o aparecimento dos picos de oxidação P_1 e P_2 da RCA 60, concordantes com os picos observados para a medida convencional, confirmando a adsorção da RCA 60 e/ou de seus produtos de oxidação (eletroativos



ou não na faixa de potencial de trabalho) à superfície do CV, **Figura 4.8A**. Comportamento similar foi observado em solução tampão borato pH 9,0.

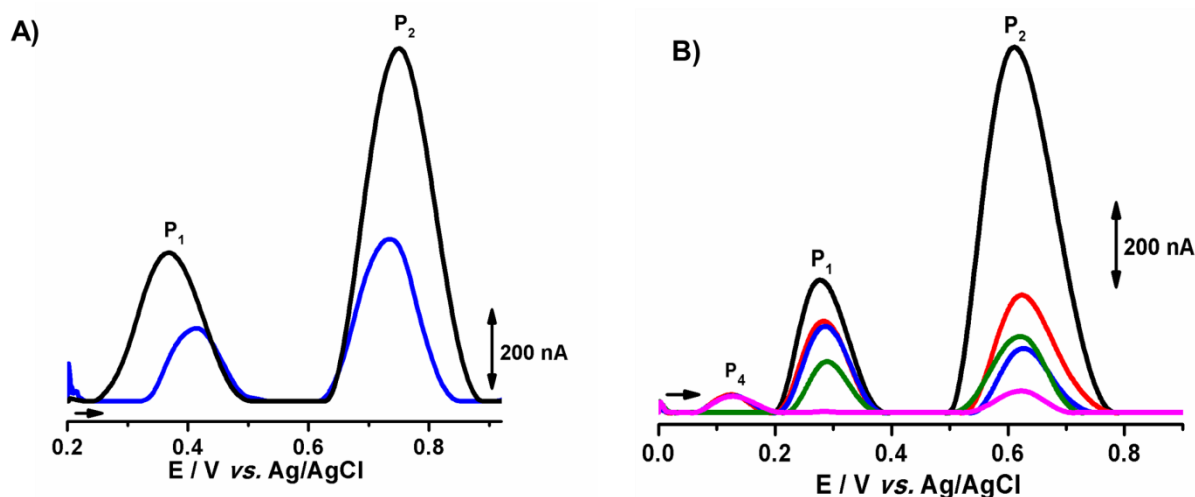


Figura 4.8– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida correspondentes ao efeito de adsorção da RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CV. A) pH 7,0: (—) medida convencional e (—) adsorção livre por 10 minutos. B) Medida convencional em pH 9,0 (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a, (—) 2^a varreduras após transferência do eletrodo a solução tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$.

Convencionalmente, três voltamogramas sucessivos foram registrados para uma solução de RCA 60 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre CV em meio tampão borato pH 9,0. O decréscimo progressivo da corrente do pico P_1 e P_2 , **Figura 4.8B**, foram possivelmente causados pela diminuição da área eletroativa disponível na superfície do eletrodo devido à adsorção da RCA 60 e/ou seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho). Com isso, um segundo teste de adsorção em tampão (seção 3.5) foi realizado iniciando-se com a lavagem do CV com água deionizada, após as medições convencionais, seguida pela imersão em uma solução tampão borato pH 9,0 recém preparada, em que os voltamogramas foram registrados. Os dois processos de oxidação foram identificados na ausência de RCA 60 na solução tampão, **Figura 4.8B**, corroborando com o efeito da adsorção da RCA 60 sobre o eletrodo de CV, nas leituras convencionais. Comportamento similar foi observado em solução tampão fosfato pH 7,0.



4.2.4 Sítios eletroativos da RCA 60

Devido à complexidade da molécula de RCA 60, os centros eletroativos advêm dos 17 AA (≈ 516 resíduos de AA) que a constituem, além da contribuição do AA Trp, a saber: Asp, Thr, Ser, Glu, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Tyr, Ala, Val e Arg (seção 2.2.1.1.1). Conforme a literatura, a oxidação eletroquímica dos AA Cys (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011b), Met (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011b), Tyr (CHENG, CHEN e ZHANG, 2011) e Trp (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011a) apresenta semelhança com o comportamento eletroquímico da RCA 60.

Estudos recentes sobre a oxidação eletroquímica do AA Cys, em solução tampão fosfato (pH 7,0), sobre os eletrodos de CV e DDB por VPD, demonstraram a presença de duas ondas de oxidação ($P_1 \approx + 0,4$ V e $P_2 \approx + 0,8$ V). Os autores atribuem que o P_1 pode estar relacionado com a oxidação do grupo sulfidril (-SH) em um radical que recebe ataque nucleofílico pela molécula de água formando o radical sulfínico, este oxidado a ácido cistéico e também a cistina, que após reagir com outro radical forma uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de Cys. Já o P_2 corresponde à oxidação do ácido sulfínico em ácido cistéico (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011). No mesmo estudo, comprova-se que o AA Met também se oxida sobre CV e DDB em tampão (pH 7,0) no mesmo potencial de pico da Cys. Pela proximidade dos potenciais de pico com os observados no presente trabalho, um julgamento prévio pode ser atribuído sobre o mecanismo da RCA 60 e provavelmente os centros eletroativos da RCA podem ser os supostos picos provenientes de ambos os aminoácidos (ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011).

Outro estudo evidencia para a oxidação eletroquímica do AA Tyr ($E_p = + 0,807$ V) sobre CV em tampão pH 7,0 (CHENG, CHEN e ZHANG, 2009), consistente com o P_2 da RCA 60.

Um esquema ilustrativo do mecanismo de reação da RCA 60 em pH 7,0 está apresentado na **Figura 4.9**. No entanto, para uma associação definitiva dos picos P_1 , P_2 e P_4 se faz necessário uma investigação sobre a eletroquímica dos AA constituintes da RCA 60 no intuito de inferir com maior segurança quanto à



proposição de um mecanismo de reação para esta glicoproteína. O P_3 não foi incluído neste esquema por não apresentar resposta eletroquímica em pH 7,0.

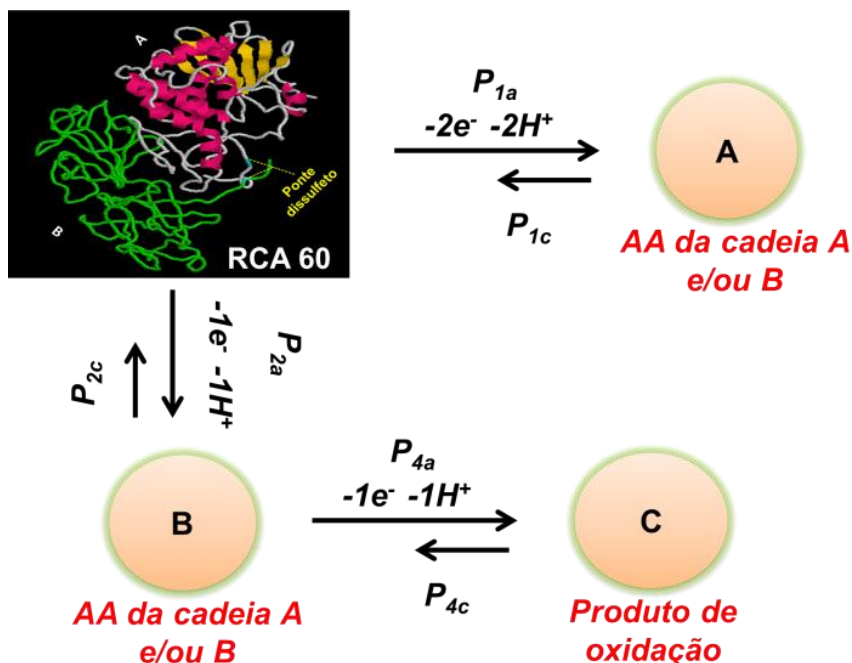


Figura 4.9– Esboço ilustrativo do provável mecanismo de reação para a oxidação eletroquímica da RCA 60 em pH 7,0.

4.2.5 Comportamento eletroquímico da RCA 60 extraída de diferentes cultivares de mamoneira

Comportamento eletroquímico similar foi observado ao registrar VOQ, **Figura 4.10**, em solução tampão fosfato de pH 7,0, nas mesmas condições experimentais para amostras de RCA 60 extraídas de diferentes cultivares de mamona (Paraguaçu, Nordestina e Energia), o que evidencia a possibilidade para a implementação de um método voltamétrico para controle de qualidade da RCA 60 em amostras oriundas de diferentes cultivares.

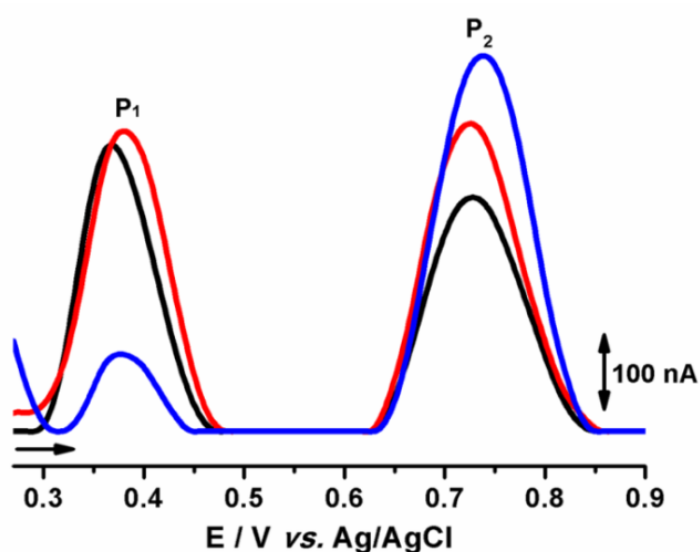


Figura 4.10– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em tampão fosfato (pH 7,0) sobre CV: (—) RCA 60 BRS Paraguaçu ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (—) RCA 60 BRS Nordestina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (—) RCA 60 BRS Energia ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

4.3 Determinação voltamétrica da RCA 60 sobre CV

A otimização das condições operacionais de análise, constituem etapas necessárias à implementação da metodologia em desenvolvimento.

4.3.1 Comparação do perfil voltamétrico da RCA 60 com a RCA-A 30

Voltamogramas comparativos para a RCA 60 extraída da cultivar BRS Nordestina e o padrão analítico da RCA-A 30 foram registrados sobre eletrodo de CV em solução tampão fosfato pH 7,0, **Figura 4.11**.

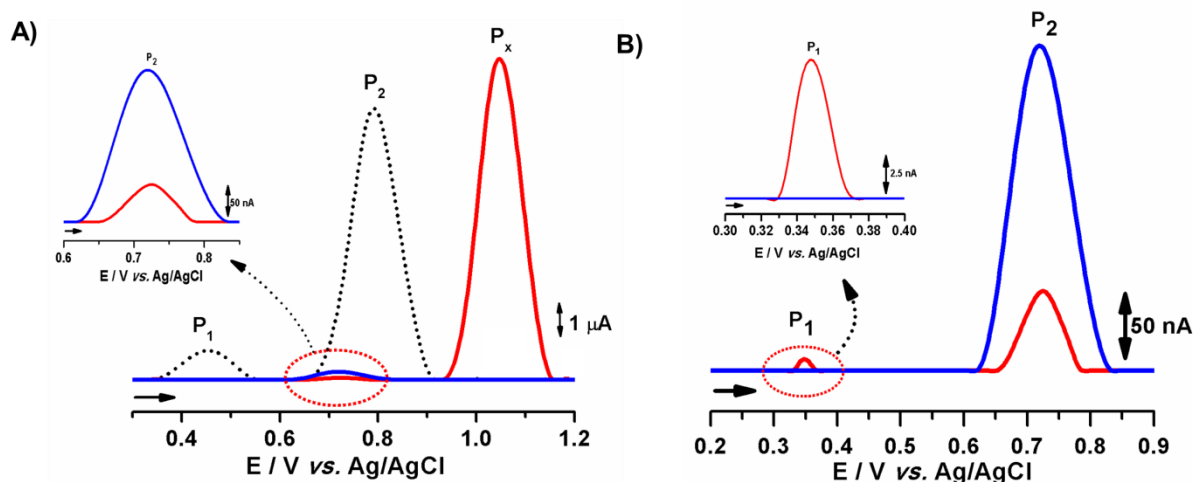


Figura 4.11– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em CV e tampão fosfato (pH 7,0). A) (...) RCA 60 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste); (—) RCA 60 $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste) e (—) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ (RCA-A 30). B) Destaque para a região 0,2 a 0,9 V: (—) RCA 60 $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (BRS Nordeste) e (—) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ (RCA-A 30). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

Sinais correspondentes à oxidação da RCA 60, extraída da cultivar BRS Nordeste para um nível máximo de concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, **Figura 4.11A**, foram identificados em $P_1 \approx +0,45 \text{ V}$ e $P_2 \approx +0,80 \text{ V}$, concordantes com os picos observados para os estudos conduzidos para a RCA 60 extraída da cultivar BRS Paraguaçu, apresentados anteriormente. Para um nível de concentração mínimo de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a BRS Nordeste, observa-se ausência do pico P_1 , **Figura 4.11B**, e o aparecimento apenas do pico P_2 , o qual tem sua oxidação iniciada no mesmo potencial para níveis de concentração maior de RCA 60, **Figura 4.11A**. A ausência do pico P_1 pode estar associado à baixa sensibilidade do eletrodo para detectá-lo nesse nível de concentração ou está relacionado a efeitos degradativos da cadeia B da RCA 60, uma vez que ela é constituída por sítios de ligação a galactose. Por outro lado, ambos os picos P_1 e P_2 foram identificados para uma solução $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30, sendo P_1 menos sensível, **Figura 4.11B**. Esse fato pode estar associado à ausência da contribuição da cadeia B no padrão analítico da RCA-A 30, sendo o pico também dependente dos aminoácidos que a constitui, este fato não pode ser comprovado experimentalmente por não dispormos do padrão analítico da RCA-B 60 para fins investigativos.



Para fins analíticos, devido à complexidade do sistema será investigado apenas o pico P_2 pela semelhança eletroquímica observada nos voltamogramas da RCA 60 extraída da cultivar BRS Nordestina e o padrão analítico correspondente à cadeia A, **Figura 4.11A**. Além disso, uma maior sensibilidade analítica da RCA-A 30 sobre CV pode ser observada através do pico P_2 .

Na região de potenciais entre +0,95 V a +1,2 V, **Figura 4.11A**, observamos o aparecimento de um novo pico de alta intensidade, denominado pico P_x em +1,05 V, presente apenas na solução do padrão analítico da RCA-A 30 em tampão fosfato pH 7,0, tendendo a deslocar-se para potenciais próximo a 0,8 V em meio fortemente alcalino (não mostrado), conforme estudo realizado para o eletrodo DDB. Todavia este pico pode não apresentar nenhuma relação com a oxidação eletroquímica da ricina, e sim estar associado aos aditivos presentes no próprio padrão analítico (glicerol, galactose e ditioeritritol). Ressalte-se que estudos desenvolvidos por [Simões, Baranton e Coutanceau \(2010\)](#) evidenciaram um pico de oxidação em 0,8 V para a eletro-oxidação do glicerol sobre superfície de paládio em meio NaOH 1 mol L⁻¹ na presença de 0,1 mol L⁻¹. Resultados similares foram observados por [Kwon e Koper \(2010\)](#) empregando um eletrodo de platina.

4.3.2 Regeneração da superfície do eletrodo de trabalho

Diversos estudos sistemáticos foram realizados a fim de conseguir a melhor condição para regeneração da superfície do CV. Dentre estes, destaca-se a limpeza do CV em acetonitrila, tratamentos eletroquímicos na solução tampão ou ácido nítrico, usando varreduras lineares com aplicação de sobrepotencial (acima do potencial de meia-onda da RCA 60 até o potencial suportado pelo CV) ou mesmo usando uma etapa de condicionamento anódica (+1,5 V por 10 s) e catódica (-1,2 V por 20 s). Mesmo diante de tantas alternativas, o efeito de adsorção persistiu sobre o eletrodo d CV.

Surfactantes vêm sendo largamente utilizados em processos eletroquímicos de compostos biológicos e drogas ([ATTA et al., 2007](#)), uma vez que esses materiais promovem a modificação da superfície ativa do eletrodo minimizando a adsorção de



produtos de oxidação na superfície eletródica, evitando a passivação do eletrodo e como consequência a perda de resposta analítica. Em adição, um parâmetro importante e característico de cada tensoativo é a sua concentração micelar crítica (CMC). Desse modo, valores abaixo da CMC implicam que as moléculas do tensoativo existem na forma de monômeros dispersos e a partir dela tendem a formar micelas (agregados moleculares de dimensões coloidais). Sendo assim, soluções de surfactantes foram adicionadas ao eletrólito de suporte, visando à minimização dos efeitos de adsorção da RCA 60 e/ou seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho).

No presente trabalho, o parâmetro avaliativo do efeito do surfactante sobre a resposta eletroquímica da RCA 60 em CV foi à minimização do efeito de adsorção, como consequência a maximização da corrente de pico e resolução do pico. Para fins investigativos foi estudada a influência de três agentes tensoativos: brometo de hexadeciltrimetil amônio (BCTA, catiônico, CMC $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$), dodecil sulfato de sódio (DSS, aniônico, CMC $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$) e Triton X-100 (não iônico, CMC $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), (HOLMBERG *et al.*, 2002; HUNTER, 1992). Soluções estoque de cada um foram preparadas e diluídas na célula eletroquímica contendo tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) como eletrólito de suporte. Os perfis voltamétricos da RCA 60 foram investigados em três pontos distintos de concentração, tendo como referência valores iguais, inferiores e superiores a CMC, **Figura 4.12**.

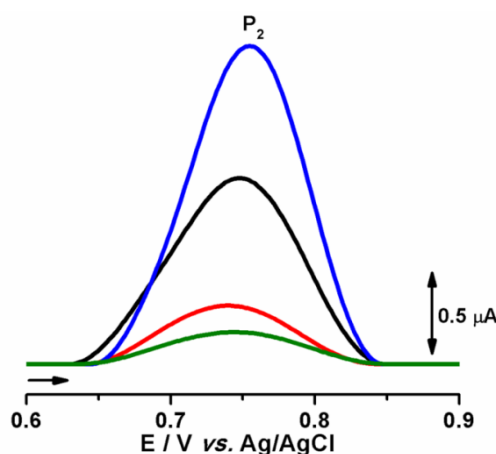


Figura 4.12– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em CV e tampão fosfato (pH 7,0) de uma solução $1,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em diferentes surfactantes: (—) sem surfactante, (—) DSS $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (—) BCTA $7,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) triton X-100 $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.



Para todos os surfactantes testados, concentrações maiores ou iguais a CMC promoveram um efeito contrário ao esperado, ou seja, diminuíram ou impediram o sinal analítico da RCA 60 sobre o CV. Neste momento presumiu-se que o desaparecimento do sinal analítico possa estar associado à baixa afinidade do analito a concentrações maiores ou iguais a CMC do surfactante ou à adsorção da RCA 60 sobre o CV seja uma etapa determinante da reação e a ação do surfactante promova a perda do sinal. Por outro lado, valores abaixo da CMC favoreceram a oxidação eletroquímica da RCA 60 em CV, sendo que o efeito dos surfactantes BCTA e triton X-100 promoveram um resultado negativo em termos de sensibilidade da RCA 60 quando comparado com o perfil voltamétrico da glicoproteína na ausência dos surfactantes, **Figura 4.12**.

Embora um ganho de sensibilidade e resolução do sinal analítico tenha sido observado ao empregar DSS como surfactante, não se justifica o uso deste para fins analíticos no presente estudo, uma vez que, não se comprovou a minimização do efeito de adsorção da RCA 60 ao CV, mesmo variando as concentrações de DSS na faixa de 0,7 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, abaixo da CMC, para três varreduras sucessivas de potencial. A corrente de pico de oxidação da RCA 60 apresentou um valor máximo para uma concentração de 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, **Figura 4.12**. Ressalte-se que no intervalo de potencial considerado, não houve processo de oxidação do DSS na presença do eletrólito de suporte. Outro fator relevante é que abaixo da CMC, a formação de micelas sobre a superfície do CV não é favorecida. No entanto, no caso de concentrações relativamente altas, abaixo da CMC do DSS, pode ocorrer formação superficial de filme na superfície do CV. Com isso, supõe-se que quando a RCA 60 aproxima-se da sua vizinhança ocorre uma atração eletrostática entre a porção não polar do DSS adsorvida ao CV e a porção lipofílica da RCA 60, permitindo a pré-concentração da RCA 60, favorecendo o ganho de resposta analítica.

Esses resultados corroboram com os estudos descritos abaixo, que comprovaram a eficiência do efeito surfactante em aumentar significativamente a sensibilidade analítica às medidas voltamétricas em baixas concentrações:



✦ [Yardim e Sentürk \(2011\)](#) demonstraram significativa ação do surfactante aniônico DSS ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), tendo promovido aumento da cinética reacional de fitohormônio em eletrodo de grafite, usando VOQ sem evidências de perda de resolução. Em outro trabalho, [Yardim et al., \(2011\)](#) investigaram o comportamento eletroquímico do benzo[a]pireno sobre eletrodo de DDB sob ação do surfactante DSS e, posteriormente, promoveram a sua determinação usando stripping voltamétrico adsortivo.

Eletrodos de DDB apresentam baixa capacidade adsortiva para moléculas orgânicas, fazendo com que a determinação de proteínas ([EINAGA, 2010](#)) e de compostos biológicos ([ENACHE e OLIVEIRA-BRETT, 2011](#)) sejam favorecidas pelo uso de DDB. Assim, a eletroatividade da RCA 60 foi investigada sobre a superfície de DDB.

Registre-se que no caso do DDB, uma melhor regeneração superficial foi constatada após uma varredura de potencial entre as medições sem pré-concentração.

4.4 Determinação voltamétrica da RCA-A 30 sobre DDB

4.4.1 Polarização do eletrodo de DDB

A literatura recomenda o uso de uma polarização anódica (+3,0 V) para limpar a superfície do DDB e uma polarização catódica (-3,0 V) para ativar a superfície do DDB, ambas aplicadas por um tempo de 30 min em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ou em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 ([OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRET, 2010](#)). No entanto, [Salazar-Banda et al., \(2010\)](#) observaram que a exposição do DDB a exaustiva polarização catódica ocasiona a degradação física da superfície do DDB, corroborando com um fenômeno denominado erosão cavitativa (remoção de material causada por cavitação). Com isso afirmam que polarizações anódicas e catódicas



por 60 s e 120 s em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, sejam suficientes para regenerar a superfície do DDB, tornando-a ativa para eletroanálise.

O efeito da polarização foi avaliado através dos voltamogramas cíclicos registrados, antes e após os tratamentos superficiais, **Figura 4.13A**, para o sistema reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ usando uma solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

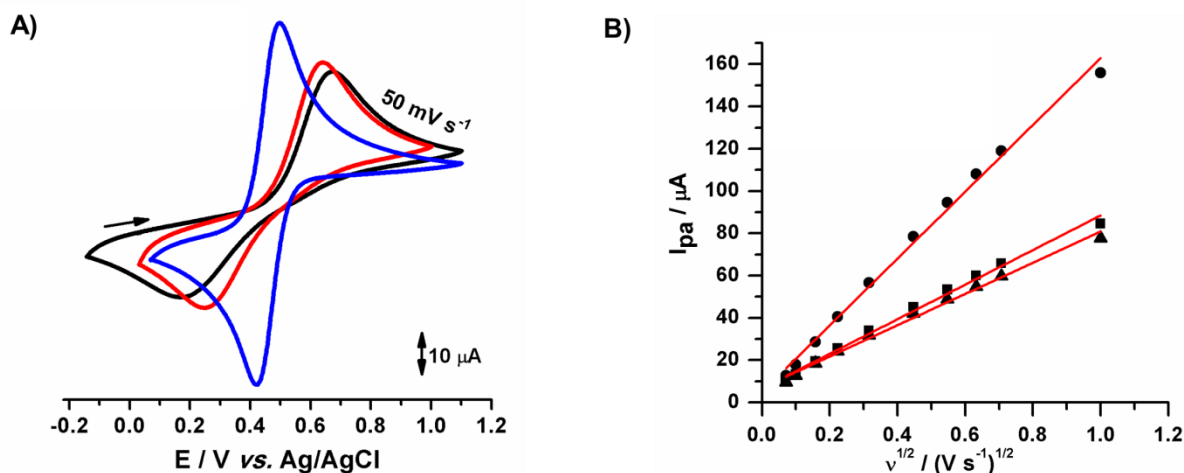


Figura 4.13– A) Voltamogramas cíclicos para o sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) sobre DDB (8.000 ppm de boro): (—) sem polarização, (—) polarização catódica e (—) polarização anódica. B) Relação do I_{pa} com a $v^{1/2}$: (●) polarização catódica, (■) polarização anódica e (▲) sem polarização.

Observa-se que a cinética de reação do par redox é bastante influenciada pelo tipo de tratamento utilizado. Se por um lado o perfil voltamétrico do sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, após polarização catódica, é totalmente reversível ($|I_{pa}/I_{pc}| = 1,05$ e $\Delta E_p = 73 \text{ mV}$), por outro, polarização anódica (+3V por 60 s) revela resposta quase-reversível ($|I_{pa}/I_{pc}| = 1,53$ e $\Delta E_p = 405 \text{ mV}$). Este último comportamento também é observado para o eletrodo sem nenhuma polarização ($|I_{pa}/I_{pc}| = 1,57$ e $\Delta E_p = 474 \text{ mV}$).

Estudos similares foram realizados variando a velocidade de varredura de 5 a 1.000 mV s^{-1} e as propriedades eletroquímicas para o DDB estão apresentadas na **Tabela 4.1**. No intervalo de velocidades estudado, observam-se respostas quase-reversíveis para o DDB como recebido e polarizado anodicamente, assumindo comportamento totalmente reversível para polarização superficial catódica, este



associado ao aumento da velocidade de transferência de carga dada em função de uma maior condutividade da superfície do DDB.

Tabela 4.1– Propriedades eletroquímicas do DDB para o sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ frente ao tipo de polarização superficial.

ν (mV s^{-1})	Propriedades eletroquímicas do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ sobre DDB					
	Como adquirido		Polarizado anodicamente		Polarizado catodicamente	
	$ I_{pa}/I_{pc} $	ΔE_p (mV)	$ I_{pa}/I_{pc} $	ΔE_p (mV)	$ I_{pa}/I_{pc} $	ΔE_p (mV)
5	1,42	305	1,33	210	1,05	68
10	1,44	361	1,39	270	1,05	70
25	1,50	423	1,47	327	1,04	70
50	1,57	474	1,53	405	1,05	73
100	1,75	532	1,71	417	1,05	77
200	1,87	587	1,88	458	1,05	83
300	1,93	615	2,02	488	1,05	89
400	2,01	632	2,12	506	1,06	93
500	2,05	654	2,22	519	0,96	97
1.000	5,52	754	8,13	606	1,06	111

Independente do tipo de tratamento superficial utilizado, a relação linear da I_{pa} em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$), **Figura 4.13B**, é um indicativo de que a transferência de massa a superfície do DDB é controlada por difusão. Em adição, as inclinações dos gráficos $\log I_{pa}$ vs. $\log \nu$ revelam inclinações da ordem de 0,39, 0,41 e 0,48 para o DDB não polarizado, polarizado anodicamente e catodicamente, respectivamente, confirmando a natureza do transporte de massa por difusão das espécies para a superfície do DDB.

4.4.2 Oxidação eletroquímica da RCA-A 30 sobre DDB

Voltamogramas de onda quadrada, **Figura 4.14**, foram registrados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) sobre o eletrodo de DDB recém polarizado, primeiro anodicamente (+3 V por 60 s) e depois catodicamente (-3 V por 120 s), em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, conforme experimental (seção 3.4).

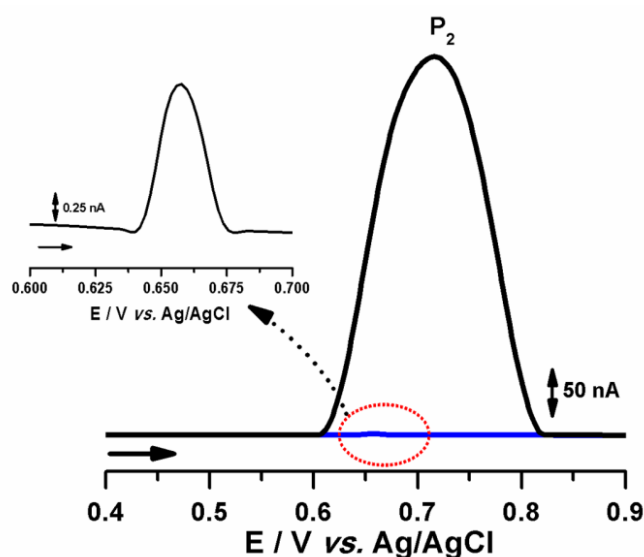


Figura 4.14– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em DDB (8.000 ppm) de uma solução $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em tampão fosfato (pH 7,0). (—) DDB polarizado catodicamente e (—) DDB polarizado anodicamente. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

O pico de oxidação P_2 , possivelmente associado à RCA-A 30, foi identificado em um potencial de pico +0,72 V com maior intensidade com o DDB polarizado catodicamente. Uma possível explicação à baixa sensibilidade do analito ao DDB polarizado anodicamente, pode estar associada ao fato de que esta polarização produz um excesso de oxigênio superficial e, portanto, o eletrodo possui uma carga superficial negativa que promove uma repulsão eletrostática frente à espécie eletroativa, que possivelmente, também se encontra carregada negativamente, dificultando assim, a reação de transferência eletrônica, esta facilitada com o DDB polarizado catodicamente, devido também a sua maior condutividade superficial (OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2010; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006).

Polarizações na própria solução tampão ou mesmo na presença do analito não são aconselháveis, pois pode ser promovida a redução de espécies presentes no eletrólito ou na solução do analito, de modo que ocorra adsorção dos produtos da redução na superfície do eletrodo. Com isso, um ganho de corrente pode ser observado e, assim, pode haver uma interpretação duvidosa da magnitude real do sinal analítico da espécie eletroativa em investigação. Esse fato foi comprovado em estudo quando se alterna entre as medidas uma polarização catódica (-3 V por 15 s). Estes resultados contradizem o estudo desenvolvido por Santos *et al.*, (2010).



Transferiram o DDB polarizado catodicamente (-3 V por 3 min) para a célula de medida contendo o eletrólito de suporte e o hormônio estriol, sendo conduzida uma polarização sob agitação em -3 V por 30 s entre cada medida. Os autores reforçam que o uso desse método promoveu excelente resposta e reprodutibilidade à determinação do estriol.

Concomitantemente, estudos de VC foram realizados em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre o eletrodo de DDB polarizado catodicamente, a fim de identificar as propriedades eletroquímicas da RCA-A 30. Os voltamogramas inseridos na **Figura 4.15A**, registrados em diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50 e 100 mV s^{-1}), confirmam a existência do pico P_2 , este com características de processo irreversível, devido à ausência de pico na varredura reversa de potencial realizada até 0 V.

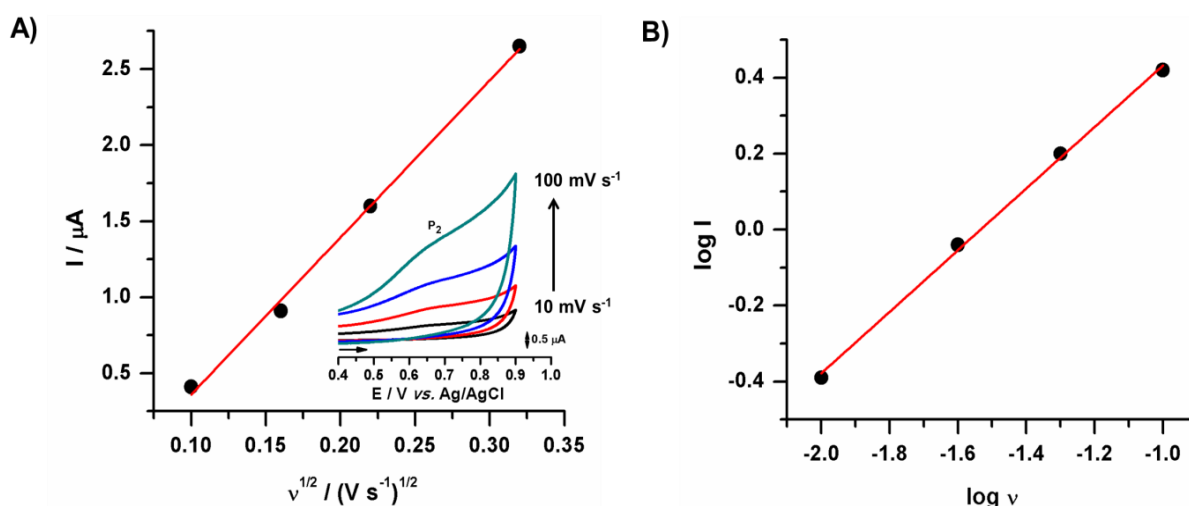


Figura 4.15– A) Relação do I_p com a $v^{1/2}$. Inserção: voltamogramas cíclicos de uma solução $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em tampão fosfato (pH 7,0) sobre DDB em diferentes velocidades de varredura. B) Relação do $\log I$ com o $\log v$.

A relação linear da I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), descrita pela **Equação 4.3**, **Figura 4.15A**,

$$I_p(A) = -0,67 \times 10^{-6} + 10,3 \times 10^{-6} v^{1/2} (\text{Vs}^{-1})^{1/2} \quad (\text{Eq. 4.3})$$



é um indicativo de que o processo de oxidação associado ao pico P_2 é controlado por difusão, confirmando a natureza do transporte de massa diagnosticada para uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RCA 60 sobre CV. Por outro lado, o gráfico de $\log I_p$ vs. $\log v$, **Figura 4.15B**, revela um valor de coeficiente angular 0,81 para o pico P_2 , indicando que a natureza do transporte de massa é governado por adsorção-difusão, ou seja, além do processo de adsorção, o processo eletroquímico envolve também uma etapa difusional (YARDIM e SENTÜRK, 2011).

O módulo da diferença entre o potencial de pico e o potencial de meia altura de pico ($|E_{p2} - E_{p2/2}|$) encontrado foi igual a 66,5 mV. Tendo em vista que, para sistemas irreversíveis governados por difusão (BRETT e BRETT, 1996) a equação é $|E_{pa} - E_{p/2}| = 47,7 \text{ mV}/(\alpha n_a)$, onde α é o coeficiente de carga de transferência anódica e n_a o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade, estima-se um valor de αn_a equivalente a 0,72. Adotando um valor de $\alpha = 0,5$, obtém-se um valor de $n_a = 1,44 e^-$. Logo, o pico P_2 , correspondente ao processo de oxidação irreversível da RCA-A 30, envolve a transferência de $1e^-$, concordante com os estudos da frequência da VOQ (seção 4.4.5).

A **Equação 4.3** pode ser confrontada com a equação de Randles-Sevcik, **Equação 4.4**, definida para sistemas irreversíveis ou quase-reversíveis em que o transporte de massa é governado por difusão (BARD e FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

$$I_p (A) = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C_{RCA-A 30} D_{RCA-A 30}^{1/2} v^{1/2} (Vs^{-1})^{1/2} \quad \text{Eq. 4.4}$$

onde: n é o número de elétrons transferidos durante a oxidação da RCA-A 30 ($n = 1e^-$) determinado por VOQ (seção 4.4.5); α é o coeficiente de transferência de carga; n_a é o número de elétrons envolvido no passo de transferência de carga ($\alpha n_a = 0,72$); $D_{RCA-A 30}$ é o coeficiente difusional da RCA-A 30 em $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$; A é a área do DDB em cm^2 estimada em $0,22 \text{ cm}^2$; $C_{RCA-A 30}$ é a concentração em mol cm^{-3} (equivalente a $1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-3}$) e v em V s^{-1} . Como a relação linear I_p vs. $v^{1/2}$ possui uma inclinação de $10,3 \times 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1}$, logo o valor do coeficiente difusional da RCA-A 30 em solução tampão fosfato pH 7,0 foi estimado, $D_{RCA-A 30} = 2,0 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Este valor é duas vezes maior que o coeficiente difusional obtido para a RCA 60 sobre eletrodo de CV.



Paralelamente à VC, experimentos usando VOQ foram executados em diferentes valores de pH. Na **Figura 4.16** observa-se a separação das correntes de pico em que é possível observar que a corrente resultante para o pico P_2 , em pH 7,0 e 1,0, advém praticamente da contribuição da corrente da varredura direta (anódica), com contribuição mínima da corrente reversa (catódica).

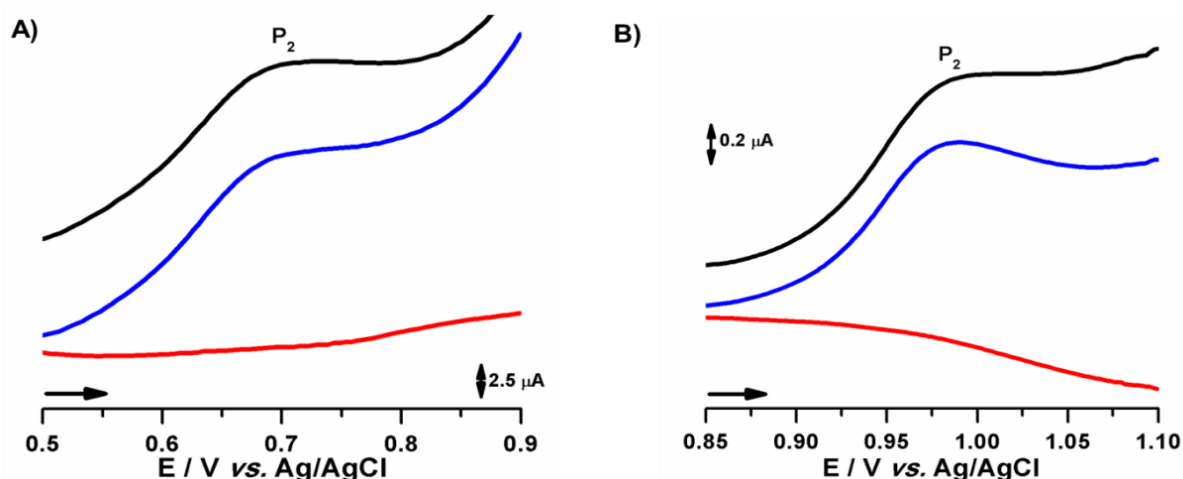


Figura 4.16– Voltamogramas de onda quadrada sobre DDB polarizado catodicamente. A) $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$. B) $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0): (—) I_t , (—) I_d e (—) I_r . $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $f = 35 \text{ s}^{-1}$ e t_d (circuito aberto) = 120s.

A proximidade da corrente resultante com a componente direta confirma a irreversibilidade da reação de oxidação da RCA-A 30. Esses resultados contradizem a oxidação quase-reversível observada para uma solução $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA 60 sobre CV.

O efeito de adsorção da RCA-A 30 sobre a superfície do DDB, **Figura 4.17**, foi avaliado conforme procedimento adotado para o CV, seção 4.2.3.

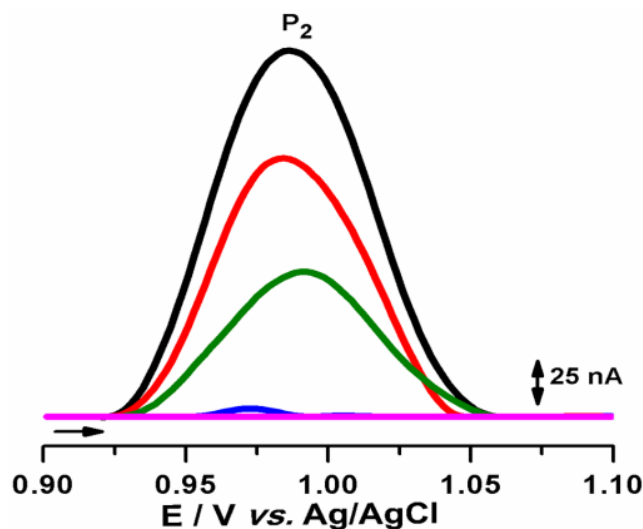


Figura 4.17– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida correspondentes ao efeito de adsorção da RCA-A 30 $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre DDB polarizado catodicamente em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medida convencional em pH 1,0 (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a, (—) 2^a varreduras após transferência do eletrodo a uma solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ recém preparada. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $f = 50 \text{ s}^{-1}$.

Convencionalmente, três voltamogramas sucessivos foram registrados para uma solução de RCA-A 30 $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre DDB em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0. O decréscimo progressivo da corrente do P₂ foi possivelmente causado pela diminuição da área eletroativa disponível na superfície do eletrodo devido à adsorção da RCA-A 30 e/ou seus produtos de oxidação (eletroativos ou não na faixa de potencial de trabalho). Com isso, um teste de adsorção em H_2SO_4 foi realizado iniciando-se com a lavagem do DDB com água deionizada, após as medições convencionais, seguida pela imersão em uma solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0 recém preparada, onde os voltamogramas foram registrados. O processo de oxidação foi identificado na ausência de RCA-A 30 no eletrólito de suporte, **Figura 4.17**, corroborando com o efeito da adsorção da RCA-A 30 sobre o eletrodo de DDB, nas leituras convencionais.

Comportamento similar foi observado em solução tampão acetato pH 3,6 e 5,4, fosfato pH 7,0 e borato pH 9,0. A superfície do DDB foi regenerada através de uma polarização anódica e catódica, nas condições definidas experimentalmente, para as medidas subsequentes.



4.4.3 Influência do pH sobre a resposta voltamétrica da RCA-A 30

Os voltamogramas de onda quadrada, **Figura 4.18A**, foram todos registrados em soluções de $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de uma solução da RCA-A 30 em diferentes eletrólitos (**Tabela 3.1**) e o efeito do pH foi investigado em uma faixa de 1,0 a 9,0.

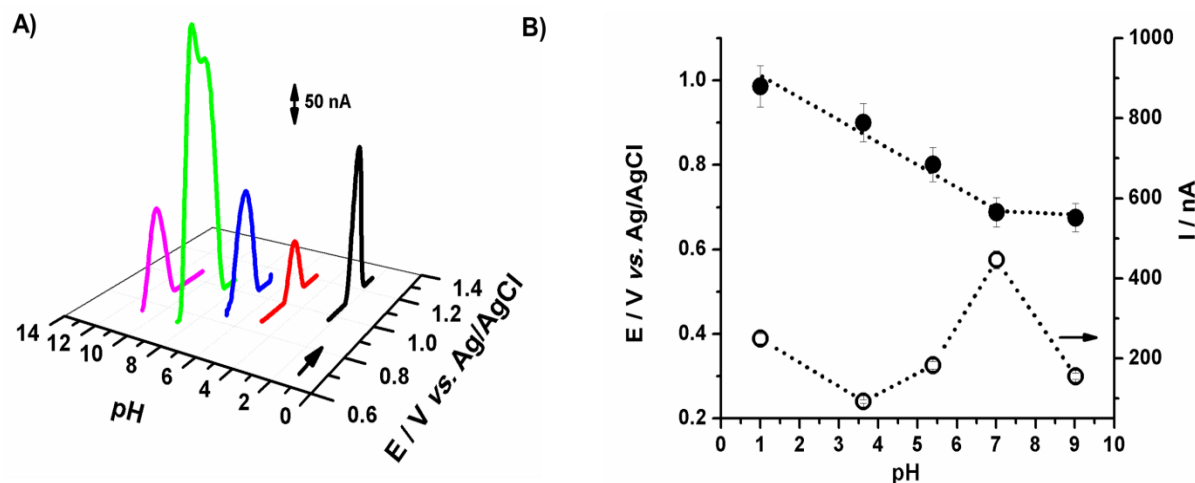


Figura 4.18– A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB em diferentes eletrólitos em função do pH. B) Relação do E_p e I_p com o pH: (●) E_p e (○) I_p . $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

Para valores de $1,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, os potenciais de pico P_2 exibem uma dependência linear com o pH e deslocam-se para valores mais negativos com o aumento do pH, indicando que a oxidação da molécula, nas condições dos experimentos, envolve processo de protonação e depende do pH do meio. A relação linear, **Figura 4.18B**, revelou uma inclinação de $-49,0 \text{ mV/pH}$ para o pico P_2 , indicando um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons para ambos processos (SMITH, 2006).

O número de prótons envolvidos na reação de oxidação da RCA-A 30 pode ser determinado através da relação apresentada na **Equação 4.4** abaixo:

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \text{pH}} = \frac{-59H^+}{an} \quad (\text{mV} / \text{pH}) \quad (\text{Eq. 4.5})$$



Utilizando o valor de αn de 1,6 calculado por meio da inclinação da relação E_p vs. $\log f$ (seção 4.3.3.4), o número de prótons H^+ por molécula da RCA-A 30 é 1,3 ($1H^+$). Como o processo apresenta o mesmo número de elétrons, assim, concluímos que o mecanismo de reação de oxidação correspondente à RCA-A 30 envolve a transferência de 1 próton H^+ e $1e^-$. O número de elétrons determinado experimentalmente usando o eletrodo de DDB corrobora com o número de e^- determinados por VC e está em concordância com o número de prótons e elétrons determinados para a RCA 60 usando CV na faixa $2,2 \leq pH \leq 10,2$ estudada por VPD.

Para $pH \geq 7,0$, **Figura 4.18B**, o potencial do pico P_2 tende a não depender do pH, indicando que nesta faixa de pH o mecanismo da reação envolveria apenas a transferência elétrons, podendo seus produtos de oxidação sofrer desprotonação química em meio alcalino.

Embora seja observado um máximo de corrente de pico em pH 7,0, uma provável sobreposição de pico, sugere o uso do pH 1,0 para fins analíticos. Ressalta-se que o máximo de corrente foi observado em pH 7,0 para uma solução $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ RCA 60 sobre CV.

4.4.4 Estudo de pré-concentração

Frente aos efeitos de adsorção no nível de concentração estudada para o estudo do pH, decidiu-se baixar a concentração da proteína a fim de minimizar os efeitos de adsorção sobre o DDB e analisar a capacidade de adsorção da RCA-A 30 sobre o DDB por meio de estudos de pré-concentração, em circuito aberto sobre a superfície do eletrodo, em diferentes tempos de acumulação. Pré-concentrações em circuito aberto foram observadas para 120 s e 300 s de acumulação, sob agitação (**Figura 4.19**). Optou-se por um tempo de pré-concentração de 120 s por atender a uma boa condição de compromisso entre sensibilidade e tempo de análise. Desse modo, a forte adsorção da RCA-A 30 sobre a superfície do eletrodo possibilitou sua pré-concentração por adsorção com consequente desenvolvimento de um método de análise para sua determinação em nível traço por stripping voltamétrico anódico.

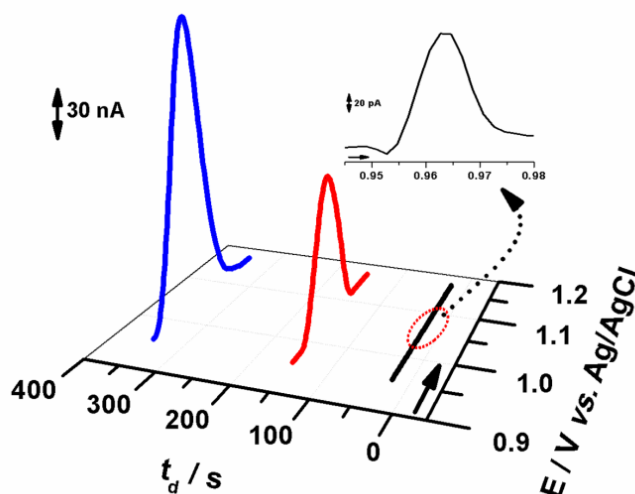


Figura 4.19– Voltamogramas de onda quadrada de uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB em diferentes tempos de pré-concentração em circuito aberto. Ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0), com $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$. (—) $t_d = 0\text{s}$, (—) $t_d = 120\text{s}$ e (—) $t_d = 300\text{s}$.

4.4.5 Otimização dos parâmetros instrumentais voltamétricos

A fim de determinar as condições ótimas, os parâmetros voltamétricos foram estudados usando uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30. Nesse sentido, a frequência de aplicação do pulso de potencial, amplitude de pulso e o incremento de varredura foram individualmente avaliados, visando obter a melhor resposta analítica em termos de corrente e potencial de pico. As condições iniciais adotadas foram: $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$.

Assim como a velocidade de varredura está para a VC, a frequência de aplicação dos pulsos está para a VOQ, sendo esta a responsável pela magnitude do sinal analítico e conseqüentemente a sensibilidade do método (RIBEIRO, 2009; ZOSKY, 2006). Os voltamogramas inseridos na **Figura 4.20A**, apresentam o efeito da frequência sobre o sinal analítico da RCA-A 30. A faixa de frequência investigada foi de 10 a 50 s^{-1} , sendo 35 s^{-1} , a frequência escolhida por apresentar uma boa resposta analítica conferindo sensibilidade à medida. Evitamos valores maiores de frequência para mantermos o compromisso entre sensibilidade sem perdas de resolução ao construirmos a curva analítica.



Por meio do estudo da frequência da VOQ podemos inferir sobre as propriedades eletroquímicas do sistema em estudo, conforme diagnósticos observados na **Tabela 2.4**. A relação linear observada entre I vs. f (**Figura 4.20A**) e a não linearidade entre I vs. $f^{1/2}$ (**Figura 4.20B**), evidenciam a irreversibilidade da reação de oxidação da RCA-A 30, bem como a adsorção de reagente na superfície do DDB.

A relação linear entre E_p vs. $\log f$ para a oxidação eletroquímica da RCA-A 30, com os dados dos voltamogramas inseridos, **Figura 4.20A**, revela uma inclinação de 36 mV. De posse deste dado, podemos utilizar a equação de Lovric, **Equação. 4.6**, definida para sistemas irreversíveis (**Tabela 2.4**), a qual nos permite calcular o valor de αn (produto do coeficiente de transferência e do número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade) como sendo 1,6.

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log(f)} = \frac{-59}{\alpha n} \text{ (mV)} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

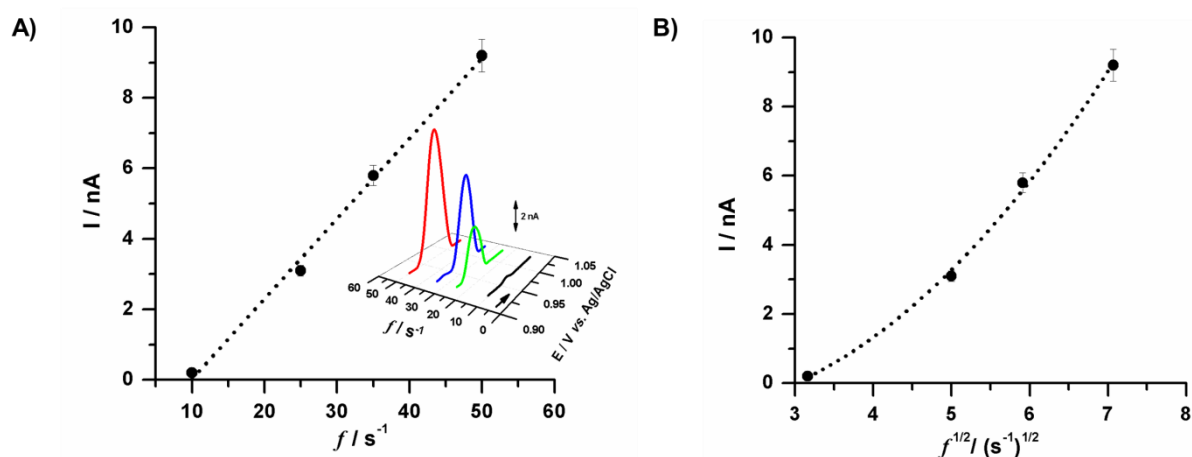


Figura 4.20– Estudo da frequência de aplicação de pulso de potencial. A) Relação I vs. f . Inserção dos voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB polarizado catodicamente. B) Relação I vs. $f^{1/2}$. H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0), $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e t_d (circuito aberto) = 120 s.

Nesse contexto, a velocidade de varredura na VOQ é resultado do produto entre frequência de aplicação do pulso e o incremento de potencial, que assim como a frequência detém influência com respeito à sensibilidade das análises. Assim, o



incremento de varredura foi investigado numa faixa de 2,0 a 5,0 mV (**Figura 4.21A**), o que revelou uma dependência praticamente constante em função do potencial de pico e uma sensibilidade maior no incremento 2 mV, logo este valor foi escolhido para os estudos seguintes. A perda de sensibilidade para valores de incremento superior a 2 mV implica em saturação da superfície do DDB e o trabalho nessa região comprometeria o desenvolvimento do método analítico.

Outra variável possível de otimização na técnica VOQ é a amplitude do pulso de potencial aplicado, **Figura 4.21B**. Sua variação influencia diretamente na seletividade do pico, que tende a ficar mais largo para altos valores de amplitude ([RIBEIRO, 2009](#); [ZOSKY, 2006](#)).

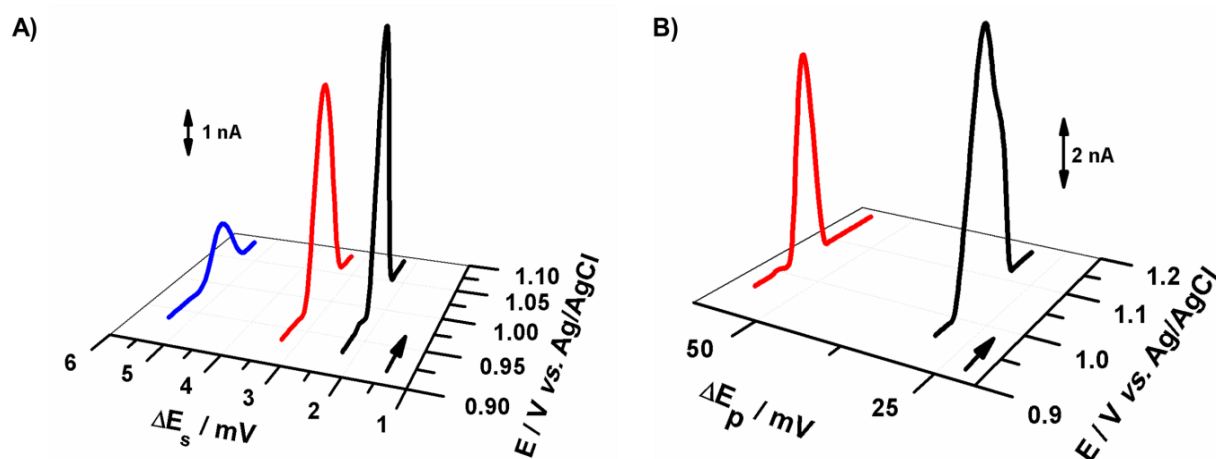


Figura 4.21– Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida de uma solução $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$ da RCA-A 30 sobre DDB polarizado catodicamente. A) Estudo do incremento. $f = 35 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$. B) Estudo da amplitude de pulso. $f = 35 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) e t_d (circuito aberto) = 120 s.

Portanto, as condições com melhor perfil voltamétrico para análise de uma solução da RCA-A 30 por VOQ foram uma f de 35 s^{-1} , ΔE_p de 50 mV e ΔE_s de 2 mV, por representar uma boa condição de compromisso entre sensibilidade e seletividade.

4.4.6 Curva analítica

A **Figura 4.22** ilustra os voltamogramas de onda quadrada e a respectiva curva analítica para uma solução da RCA-A 30 nas condições experimentais



escolhidas. Uma boa relação linear entre corrente de pico e concentração foi verificada para a faixa de concentração de $3,3 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o pico P₂. Um potencial de meia onda de 0,979 V foi identificado para o pico P₂ na faixa de concentração estudada. A equação da reta para a curva analítica construída obedece a seguinte **Equação 4.7**:

$$I_{P_2} / \mu A = 1,16 (\pm 0,009) + 6,1 \times 10^6 (\pm 0,2 \times 10^6) [RCA - A 30] / mol L^{-1} \quad (Eq. 4.7)$$

$$(R^2 = 0,9944 \text{ para } N = 6)$$

Registre-se que entre as medições era feita uma varredura sem pré-concentração na mesma solução da RCA-A 30, o que garantia uma melhor regeneração da superfície do DDB.

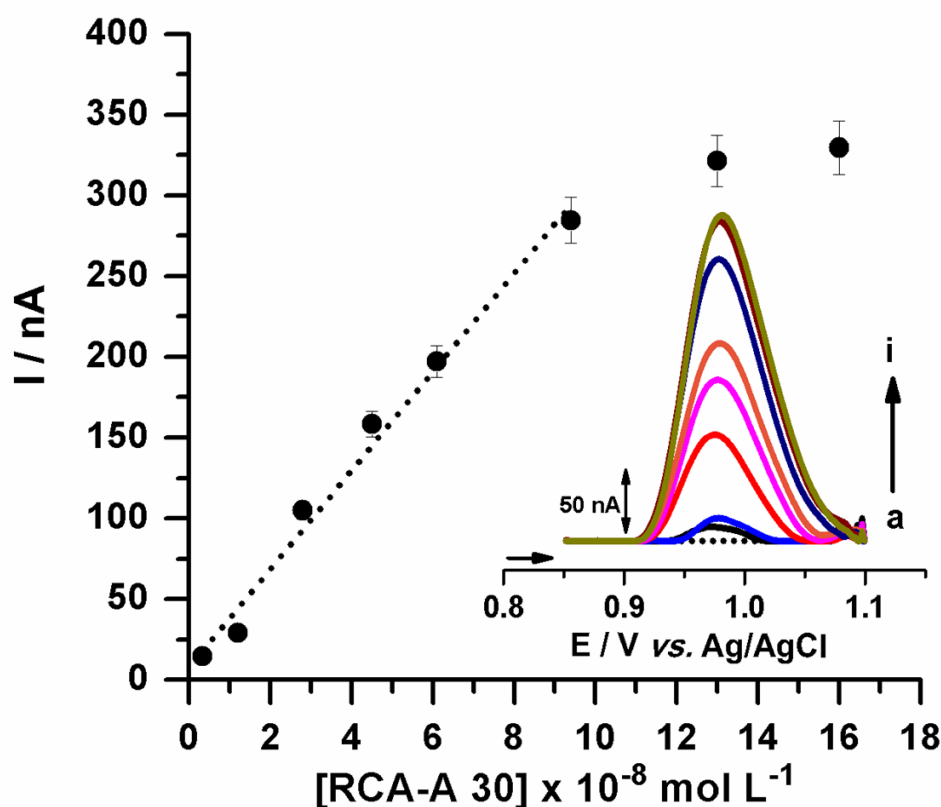


Figura 4.22– Curva analítica e inserção de voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução da RCA-A 30 em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ (pH 1,0) sobre DDB polarizado catodicamente. $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120$ s. [RCA-A 30]: (a) 0; (b) 3,3; (c) 17; (d) 28; (e) 45; (f) 61; (g) 94; (h) 130 e (i) 160 nmol L⁻¹.



4.4.6.1 Variáveis de desempenho analítico

Sabe-se que os parâmetros de desempenho analítico constituem as ferramentas requeridas para validação da metodologia analítica proposta. Nesse intuito, avaliou-se o sistema quanto a sua sensibilidade, em termos de LD e LQ e exatidão em termos de recuperação.

O LD foi calculado com base na **Equação 3.1** apresentada na seção 3.7. Foram registrados 10 brancos a fim de estimar o desvio-padrão da média aritmética ($S_b = 0,0015 \mu A$), os quais são de extrema importância para avaliar a resposta da metodologia. Sendo assim, o LD obtido foi de $6,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ou $19 \mu\text{g L}^{-1}$.

O LQ, $2,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ou $62 \mu\text{g L}^{-1}$, foi calculado mediante **Equação 3.2** apresentada na seção 3.7 e encontra-se abaixo do primeiro incremento que foi determinado na curva analítica.

Na **Tabela 4.2** está descrita uma comparação de valores de LD encontrados por diferentes técnicas usadas para a determinação de traços de ricina.

Tabela 4.2– Comparação de valores de LD encontrados por diferentes técnicas usadas para a determinação de traços de ricina. (Adaptado de [MUSSHOFF e MADEA, 2009](#))

Técnica	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Ensaio com biosensor	320	(KIRBY <i>et al.</i> , 2004)
ELISA	80	(GRIFFITHS, NEWMAN e GEE, 1986)
ELISA com medida colorimétrica	40	(KOJA, SHIBATA e MOCHIDA, 1980)
Imunoensaio	5	(SHYU <i>et al.</i> , 2002)
ELISA	5	(GALBER <i>et al.</i> , 2005)
Fluoroimunoensaio	1	(WANG <i>et al.</i> , 2005)
Teste imunocromatográfico	1	(GUGLIELMO-VIRET, SPLETTSTOESSER e THULLIER, 2007)
Sanduiche ELISA	0,2	(LEITH, GRIFFITHS e GREEN, 1988)
ELISA com quimioluminescência	0,1	(POLI <i>et al.</i> , 1994)
Ensaio com sensor microeletroquímico	0,4	(JI <i>et al.</i> , 2004)
Imunosensor amperométrico (eletrodo descartável impresso)	< 100	(SURESH <i>et al.</i> , 2007)
Sensor amperométrico (eletrodo de pó de grafite)	< 0,625	(SURESH <i>et al.</i> , 2010)
Sensor amperométrico (eletrodo de pasta de nanotubos)	< 2,5	(SURESH <i>et al.</i> , 2010)

Neste trabalho o LD calculado foi de $19 \mu\text{g L}^{-1}$, que supera os valores encontrados quando foram utilizadas às técnicas de ensaio com biosensor, ELISA e



ELISA com medida colorimétrica. Registre-se que embora o LD obtido esteja acima dos valores encontrados para as demais técnicas listadas na tabela, LD menor pode ser alcançado ao empregar um tempo de pré-concentração de 600 s.

A exatidão foi avaliada por meio do teste de recuperação em uma amostra deslipídada de RCA 60 extraída da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu. Os voltamogramas foram registrados em uma faixa de concentração de RCA-A 30, $3,3 - 9,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, pelo método de adição de padrão, **Figura 4.23**.

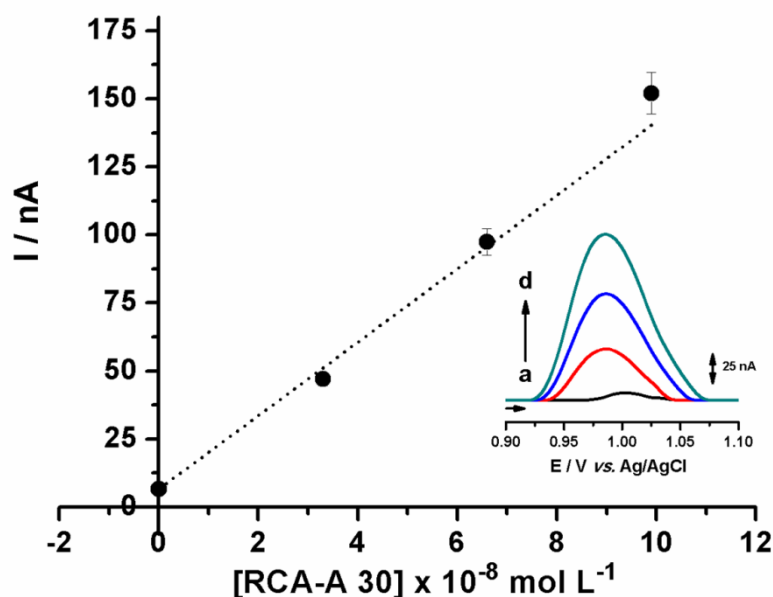


Figura 4.23– Curva analítica para adição de padrão RCA-A 30 em amostra deslipídada de RCA 60 da cultivar BRS Paraguaçu. Inserção de voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução da RCA-A 30 em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) sobre DDB polarizado catodicamente. $t_{d(\text{circuito aberto})} = 120 \text{ s}$. [RCA-A 30]: (a) amostra; (b) $3,3$; (c) $6,6$ e (d) $9,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Um nível de recuperação de 90,9% em uma amostra de RCA 60 BRS Paraguaçu foi obtido para uma concentração $3,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de RCA-A 30, **Tabela 4.3**. O valor obtido está de acordo com os limites sugeridos pelo manual da Association of Official Analytical Chemists (AOAC)¹⁵, a qual sugere uma faixa de 70 a 120% para concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$ e baixos níveis de mg L^{-1} (BRITO *et al.*, 2003).

¹⁵ AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Peer verified method program**: manual on polices and procedures. Arlington, VA, 1993.



Tabela 4.3– Resultados para o estudo de recuperação de RCA-A 30 em uma amostra de RCA 60 BRS Paraguaçu.

Amostra	[RCA-A 60] / 10^{-8} mol L ⁻¹		%R
	adicionada	recuperada (n=3)	
RCA 60 BRS Paraguaçu	3,3	3,0	90,9

Diante dos resultados alcançados, conclui-se que a forte adsorção da RCA-A 30 sobre a superfície do eletrodo de DDB, possibilitou sua pré-concentração por adsorção com conseqüente desenvolvimento de um método de análise em nível traço por stripping voltamétrico anódico. Portanto, a combinação da sensibilidade da VOQ com as propriedades únicas do eletrodo de DDB é uma excelente alternativa para a determinação de RCA-A 30 em amostras contendo baixas concentrações do composto, desde análises ambientais, até prevenção de contaminação com este composto, proposital ou não, corroborando com o baixo LD alcançado para o método desenvolvido.



CONCLUSÃO

CAPÍTULO 5



5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados por VC, VPD e VOQ evidenciaram que a RCA 60 sofre dois processos de oxidação eletroquímica ($P_1 = +0,367$ V e $P_2 = +0,751$ V) sobre o eletrodo de CV em solução tampão fosfato pH 7,0.

Um mecanismo quase-reversível foi observado com transferência de 2 prótons H^+ e $2e^-$ e 1 próton H^+ e $1e^-$ para os picos P_1 e P_2 , respectivamente. A faixa de pH para essa condição foi de 2,0 a 10,0, com observação de um produto de oxidação ocorrido em + 0,091 V (P_4) para valores de pH $\geq 7,0$, decorrente do pico P_2 . Os picos P_1 e P_2 apresentam máxima corrente em pH 7,0. Desprotonação química com a transferência de $2e^-$ (P_1) e $1e^-$ (P_2) foi observada para ambos os picos em valores de pH $\geq 10,2$, este valor identificado como o pKa da molécula. Um novo pico de oxidação P_3 surge em pH ácido, sendo o mecanismo de reação governado pela transferência de 1 próton H^+ e $1e^-$.

Embora tenha sido observado comportamento eletroquímico similar para amostras de RCA 60 de cultivares diferentes em CV, devido à forte evidência de adsorção da RCA 60 e/ou produtos de oxidação sobre a superfície do eletrodo, conclui-se para o uso do eletrodo de DDB.

Testes com o padrão analítico da RCA-A 30 revelaram o aparecimento dos picos P_1 e P_2 , sendo P_2 mais sensível e escolhido para fins analíticos. O pico P_2 apresenta características de processo irreversível em H_2SO_4 (0,1 mol L^{-1} , pH 1,0), facilitado pela pré-concentração por adsorção sobre DDB pré-tratado catodicamente. A partir da excelente resposta voltamétrica do material pré-concentrado e a otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de onda quadrada, um método de análise por stripping voltamétrico anódico foi desenvolvido para análise em nível traço da RCA-A 30. Uma curva analítica foi obtida, numa faixa linear de 3,3 a 94 nmol L^{-1} , com um limite de detecção e quantificação de 19,0 e 62,0 $\mu g L^{-1}$, respectivamente, o que comprova a excelente resposta do DDB para quantificação da RCA-A 30.

Recuperação de 90,9% foi obtida para uma concentração $3,3 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} de RCA-A 30, presente em uma amostra extraída da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu.



Tais resultados presumem a aplicação da metodologia para determinação de RCA 60 em nível traço em amostras extraídas de diferentes cultivares de mamoneira, sobretudo, em amostras contendo baixas concentrações do composto, desde análises ambientais, até prevenção de contaminação com este composto, proposital ou não.

5.1 Propostas Futuras

- ✦ Estabelecer a repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia desenvolvida usando DDB para quantificação de RCA 60.
- ✦ Investigar a adsorção da RCA 60 no CV para estudar a interação do filme formado com outros aminoácidos, visando aplicações analíticas (HUAN, SHEN e YU, 2004; LI, 2006; McTIERNAN, OMRI e CHAHMA, 2010).
- ✦ Utilizar eletrodos descartáveis para implementação do método voltamétrico para determinação da RCA 60. O uso de eletrodos descartáveis pode ser uma alternativa promissora ao CV eliminando assim, a necessidade de regeneração da superfície eletródica (NASCIMENTO e ANGNES, 1998). Em adição, esses sensores estão se tornando populares por suas características de fácil utilização, além da simplicidade, praticidade e baixo custo de aquisição (CHOI *et al.*, 2001; NASCIMENTO e ANGNES, 1998).
- ✦ Investigar a interação eletroquímica *in situ* da RCA 60 com o dsDNA mediante construção de biosensores a base de DNA, tendo como referência as pesquisas desenvolvidas por: Oliveira *et al.*, (2007); Oliveira-Brett e Diculesco (2004, parte I e II).
- ✦ Investigar a região de redução da RCA 60 em diferentes eletrodos de trabalho, conforme estudos direcionados nesta tese.
- ✦ Propor a construção de um biosensor com imobilização da enzima tirosinase na superfície do CV para detecção de RCA 60, tendo como ponto de partida o trabalho desenvolvido por Mangombo *et al.*, (2010).



-
- ✚ Fazer um estudo voltamétrico usando os principais componentes da RCA 60 sobre DDb para identificar os picos P_1 e P_2 e até o P_4 . Eles são devidos a que composto da ricina? Escrever o mecanismo.
 - ✚ Propor um método quimiométrico para classificação de RCA 60 extraída das cultivares BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Energia com base nos parâmetros I_p e E_p observados nos voltamogramas, conforme a metodologia implementada por [Gambarra-Neto et al., \(2009\)](#) para classificação de óleos vegetais. Expandir o método para classificação de amostras de torta, sementes ou rações.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 6



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, B. J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, 662, 2010, 105.

AGÜÍ, L.; MANSO, J.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Colloidal-gold cysteamine-modified carbon paste electrode as suitable electrode materials for the electrochemical determination of sulphur-containing compounds. Application to the determination of methionine. **Talanta**, 64, 2004, 1041.

ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J-P.; DOGLIOTTI, E.; DOMENICO, A. D.; FÉRNANDEZ-CRUZ, M. L.; FÜRST, P.; FINK-GREMMELS, J.; GALLI, C. L.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; LEEUWEN, R. F. V.; PETEGHEM, C. V.; VERGER, P. Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **The EFSA Journal**, 726, 2008, 38.

ALFARO, M. A. Q.; FERRO, S.; HUITLE, C. A. M.; VONG, M. Y. Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 17, 2000, 227.

ANANDAN, S.; KUMAR, G. K. A.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, 120, 2005, 159.

ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, R. Q.; FATIBELLO-FILHO, O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, 2, 2010, 402.

ATTA, N. F.; DARWISH, S. A.; KHALIL, S. E.; GALAL, A. Effect of surfactants on the voltammetric response and determination of an antihypertensive drug. **Talanta**, 72, 2007, 1438.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 2001.



BARNES, D. J.; BALDWIN, B. S.; BRAASCH, D. A. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. **Industrial Crops and Products**, 29, 2009, 509.

BARROS, R. de C. M. de; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. da S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Quim. Nova**, 28 (2), 2005, 317.

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. de, **Detoxicação e Aplicações da Torta de Mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. (Embrapa Algodão. Documentos, 217)

BELTRÃO, N. E. M. **Torta de Mamona (Ricinus communis L.): Fertilizante e Alimento**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 177)

BRADBERRY, S. Ricin and abrin. **Medicine**, 35, 2007, 576.

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

BRITO, N. M. **Métodos de identificação e quantificação de ricina e ricinina na torta de mamona**. 2005. 108 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR. O. P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão, **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, 13, 2003, 129.

BROCCHINI, S.; GODWIN, A.; BALAN, S.; CHOI, J-W.; SHAUNAK, S. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, 2008, 3.

BUNDY, F. P. Direct conversion of graphite to diamond in static pressure apparatus. **Journal of Chemical Physics**, 38, 1963, 631.

BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHED, A. Recommendations for the use of the term "recovery" in analytical procedures. **IUPAC**, 2001.



BUTERA, A. P.; SOUZA FILHO, J. D. de; CARVALHO, D. T.; FIGUEIREDO, R. C.; FARIA, L. C. A. de; NUNES, M. A.; PRADO, M. A. F.; ALVES, R. J.; ANDRADE, M. H. G. de; SILVA, K. T. S. Síntese de amidas e sulfonamidas de β -D-galactopiranosilamina e β -lactosilamina e avaliação de suas interações com lectinas de *Erythrina cristagalli* e de *Ricinus communis*. **Química Nova**, 30 (5), 2007, 1267.

CAMPOS, L. S., **Entender a Bioquímica**. 3^a Ed. Lisboa: Escolar Editora, 2002.

CANGEML, J. M.; SANTOS, A. M. dos; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. **Química Nova na Escola**, 32 (1), 2010, 3.

CHAI, C.; LEE, J.; TAKHISTOV, P. Direct detection of the biological toxin in acidic environment by electrochemical impedimetric immunosensor. **Sensors**, 10, 2010, 11414.

CHAILAPAKUL, O.; AKSHARANANDANA, P.; FRELINK, T.; EINAGA, Y.; FUJISHIMA, A. The electrooxidation of sulfur-containing compounds at boron-doped Diamond electrode. **Sensors and Actuators**, 80, 2001, 193.

CHAKRAVARTULA, S. V. S.; GUTTARLA, N. Amino acids of ricin and its pypeptides. **Natural Product Research**, 22 (3), 2008, 258.

CHEN, L-C.; CHANG, C-C.; CHANG, H-C. Electrocatalytic oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution. **Eletrochimica Acta**, 53, 2008, 2883.

CHEN, X.; YANG, Y.; DING, M.; Electrocatalytic oxidation and sensitive detection of cysteine at layer-by-layer assembled carbon nanotube-modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, 557, 2006, 52.

CHENG, H., CHEN, C.; ZHANG, C. Electrochemical behavior and sensitive determination of L-tyrosine with a gold nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Analytical Sciences**, 25, 2009, 1221.

CHENG, L., PACEY, G. E.; COX, J. A. Carbon electrodes modified with Ruthenium metallodendrimer multilayers for the mediated oxidation of methionine and insulin at physiological pH. **Analytical Chemistry**, 73, 2001, 5607.



CHOI, J-Y.; SEO, K.; CHO, S-R.; OH, J-R.; KAHNG, S-H. Jongman ParkScreen-printed anodic stripping voltammetric sensor containing HgO for heavy metal analysis. **Analytica Chimica Acta**, 443, 2001, 241.

CODOGNATO, L.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations. **Diamond and Related Materials**, 11, 2002, 1670.

COOK, D. L.; DAVID, J.; GRIFFITHS, G. D. Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonar and oral routes. **Toxicology**, 223, 2006, 61.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 55 (3), 1995, 261.

DARBY, S. M.; MILLER, M. L.; ALLEN, R. O. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. **Journal of Forensic Sciences**, 46, 2001, 1033.

DAYAN-KENIGSBERG, J.; BERTOCCHI, A.; GARBER, E. A. E. Rapid detection of ricin in cosmetics and elimination of artifacts associated with wheat lectin. **Journal of Immunological Methods**, 336, 2008, 251.

DESPEYROUX, D.; WALKER, N.; PEARCE, M.; FISHER, M.; MCDONNELL, M.; BAILEY, S. C.; GRIFFITHS, G. D.; WATTS, P. **Analytical Biochemistry**, 279, 2000, 23.

EINAGA, Y. Diamond electrodes for electrochemical analysis. **Journal of Applied Electrochemistry**, 40, 2010, 1807.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. **Electroanalysis**, 23 (6), 2011a, 1337.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. **Bioelectrochemistry**, 81, 2011b, 46.



ENSAFI, A. A.; DADKHAH-TEHRANI, S.; KARIMI-MALEH, H. A voltammetric sensor for the simultaneous determination of L-cysteine and tryptophan using a p-aminophenol-multiwall carbon nanotube paste electrode. **Analytical Sciences**, 27, 2011, 409.

ERK, N. Differential pulse anodic voltammetric determination of pantoprazole in pharmaceutical dosage forms and human plasma using glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, 323, 2003, 48.

FEI, S.; CHEN, J.; YAO, S.; DENG, G.; HE, D.; KUANG, Y. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum. **Analytical Biochemistry**, 339, 2005, 29.

FELTIS, B. N.; SEXTON, B. A.; GLENN, F. L.; BEST, M. J.; WILKINS, M.; DAVIS, T. A hand-held surface plasmon resonance biosensor for the detection of ricin and other biological agents **Journal Biosensors and Bioelectronics**, 23, 2008, 1131.

FERRO, S.; DE BATTISTI, A. Electron transfer reactions at conductive diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, 47 (10), 2002, 1641.

FIORUCCI, A. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of carbon paste electrode in the direct voltammetric determination of tryptophan in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 28, 2002, 909.

FRANCISCO Jr., W. E.; FRANCISCO, W., Proteínas: Hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de Química. **Química Nova na Escola**, 24, 2006, 12.

FRANZ, D. R.; JAAX, N. K. Ricin toxin. In: SIDELL, F. R., TAKAFUJI, E. T., FRANZ, D. R. (Eds.). **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare**. Walter Reed Army Medical Center, Washington USA, 1997. pp. 631-642.

FREIRE, R. M. M.; AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica, 2001. Cap. 13, p. 296-335.

FRÉNOY, J-P. Effect of physical environment on the conformation of ricin Influence of low Ph. **Biochemical Journal**, 240, 1986, 221.



GALBER, E. A.; EPPLEY, R. M.; STACK, M. E.; McLAUGHLIN, M. A.; PARK, D. L. Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food. **Journal of Food Protection**, 68, 2005, 1294.

GAMBARRA-NETO, F. F.; MARINO, G.; ARAÚJO, M. C. U.; GALVÃO, R. K. H.; PONTES, M. J. C.; MEDEIROS, E. P. de; LIMA, R. S. Classification of edible vegetables oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis. **Talanta**, 77, 2009, 1660.

GARBELLINI, G. S.; AVACA, L. A.; SALAZAR-BANDA, G. R. Potencialidades do uso de ultrassom na determinação do pesticida carbaril empregando eletrodos de diamante. **Química Nova**, 33 (10), 2010, 2261.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Effects of ultrasound on the degradation of pentachlorophenol by boron-doped diamond electrodes. **Portugaliae Electrochimica Acta**, 28 (6), 2010, 405.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Sonovoltammetric determination of toxic compounds in vegetables and fruits using diamond electrodes. **Food Chemistry**, 116, 2009, 1029.

GARRIDO, E. M. P. J.; GARRIDO, J. M. P. J.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical oxidation of amphetamine-like drugs and application to electroanalysis of ecstasy in human serum. **Bioelectrochemistry**, 79, 2010, 77.

GODAL, A., OLSNES, S. Pihl, A. Radioimmunoassay of abrin and ricin in blood. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 8, 1981, 409.

GOSSER Jr., D. K. **Cyclic Voltammetry**: Simulations and analysis of reaction mechanisms. New York: Wiley-VHC, 1993.

GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Southampton Electrochemistry Group. Chichester: Ellis Horwood, 1985.

GRIFFITHS, G. D.; NEWMAN, H.; GEE, D. J. Identification and Quantification of Ricin Toxin in Animal Tissues using ELISA. **Journal of the Forensic Science Society**, 26 (5), 1986, 349.



GU, Y-J.; SUN, S-G.; CHEN, S-P.; ZHEN, C. H.; ZHOU, Z-Y. Adsorption of serine on Pt single-crystal electrodes in sulfuric acid solutions. **Langmuir**, 19, 2003, 9823.

GUGLIELMO-VIRET, V.; SPLETTSTOESSER, W.; THULLIER, P. An immunochromatographic test for the diagnosis of ricin inhalational poisoning. **Clinical Toxicology (Phila)**, 45 (5), 2007, 505.

HEGDE, R. N.; HOSAMANI, R. R.; NANDIBEWOOR, S. T. Voltammetric oxidation and determination of cinnarizine at glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 72, 2009, 259.

HIRLEKAR, R.; YAMAGAR, M.; GARSE, H.; VIJ, M.; KADAM, V. Carbon nanotubes and its applications: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 2 (4), 2009, 17.

HOFFMAN, L. V.; DANTAS, A. C. S.; MEDEIROS, E. P. de; SOARES, L. S. **Ricina: um impasse para utilização da torta de mamona e suas aplicações**. Campina Grande (PB): Embrapa Algodão, 2007. (Embrapa Algodão. Documentos, 174).

HOLMBERG, K.; JONSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. London: Wiley, 2002. p. 43.

HUAN, S.; SHEN, G.; YU, R. Enantioselective recognition of amino acid by differential pulse voltammetry in molecularly imprinted monolayers assembled on Au electrodes. **Electroanalysis**, 16 (12), 2004, 1019.

HUERTA, F.; MORALLÓN, E.; VÁZQUEZ, J. L.; PÉREZ, J. M.; ALDAZ, A. Electrochemical behaviour of amino acids on Pt(hkl). A voltammetric and in situ FTIR study. Part III. Glycine on Pt(100) and Pt(110). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 445, 1998, 155.

HUERTA, F.; MORALLÓN, E.; VÁZQUEZ, J. L.; ALDAZ, A. Electrochemical behaviour of amino acids on Pt(hkl). A voltammetric and in situ FTIR study. Part IV. Serine and alanine on Pt(100) and Pt(110). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 475, 1999, 38.

IMBERT, A. et al. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, 6 (2), 2004, 221.



ISHIGURO, T.; FUNATSU, G.; HAVASHI, K.; FUNATSU, M. Biochemical studies on ricin: I. Purification of ricin. **Journal of Biochemistry**, 55, 1964, 587.

KABAT, E. A.; HEIDELBERGER, M.; BEZER, A. E. A study of the purification and properties of ricin. **Journal of Biological Chemistry**, 168, 1947, 629.

KIRBY, R.; CHO, E. J.; GEHRKE, B.; BAYER, T.; PARK, Y. S.; NEIKIRK, D. P.; McDEVITT, J. T.; ELLINGTON, D. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. **Analytical Chemistry**, 76, 2004, 4066.

KOJA, N.; SHIBATA, T.; MOCHIDA, K. Enzyme-linked immunoassay of ricin. **Toxicon.**, 18, 1980, 611.

KWON, Y.; KOPER, M. T. M. Combining voltammetry with HPLC: application to electro-oxidation of glycerol. **Analytical Chemistry**, 82, 2010, 5420.

LI, C. Voltammetric determination of tyrosine based on an L-serine polymer film electrode. **Colloids and Surfaces B**, 50, 2006, 147.

LEITE, Y .F. M. M. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1724, 2005, 137.

LEITH, A. G.; GRIFFITHS, G. D.; GREEN, M. A. Quantification of ricin toxin using a highly sensitive avidin/biotin enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of the Forensic Science Society**, 28, 1988, 227.

LER, S. G.; LEE, F. K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in detection of warfare agents - Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. **Journal of Chromatography A**, 1133 (1-2), 2006, 1.

LIGLER, F. S.; TAITT, C. R.; SHRIVER- LAKE, L. C.; SAPSFORD, K. E., SHUBIN, Y.; GOLDEN, J. P. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 377, 2003, 469.

LINDSEY, C. Y.; TEMPLETON, J. G. P.; MILLARD, C. B.; WANNERMACHER, R. W.; HEWETSON, J. F. Validation of ELISA for the determination of anti-ricin immunoglobulin G concentration in mouse sera. **Biologicals**, 34, 2005, 33.



LOPES, I. C.; SANTOS, P. V. F.; DICULESCU, V. C.; PEIXOTO, F. M. P.; ARAÚJO, M. C. U.; TANAKA, A. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Microcystin-LR and chemically degraded microcystin-LR electrochemical oxidation. **Analyst**, 137 (8), 2012, 1904.

LORD, M. J.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **The FASEB Journal**, 8 (2), 1994, 201.

LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, 78, 2009, 748.

LUBELLI, C.; CHATGILIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. **Analytical Biochemistry**, 2006, 355, 102.

MACKINNON, P. J.; ALDERTON, M. R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. **Toxicon**, 38, 2000, 287.

MANGOMBO, Z. A.; BAKER, P.; IWUOHA, E.; KEY, D. Tyrosinase biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with a polyaniline-poly (vinyl sulfonate) composite film. **Microchim. Acta**, 170, 2010, 267.

MATSUMOTO, S.; SATO, Y.; TSUTSUMI, M.; SETAKA, N. Growth of Diamond particles from methane-hydrogen gas. **Journal of Material Science**, 17, 1982, 3112.

MATSUSHIMA, J. T.; SANTOS, L. C. D.; COUTO, A. B.; BALDAN, M. R.; FERREIRA, N. G. Influência do eletrólito na eletrodeposição de nanopartículas de C u sobre eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, 35 (1), 2012, 11.

McTIERNAN, C. D.; OMRI, K.; CHAHMA, M. Chiral conducting surfaces via electrochemical oxidation of L-Leucine-oligothiophenes. **The Journal of Organic Chemistry**, 75, 2010, 6096.

MEDEIROS, R. A.; CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of sodium cyclamate in dietary products using a boron-doped diamond electrode. **Química Nova**, 31 (6), 2008, 1405.



MEDEIROS, R. A.; CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, 76, 2008, 685.

MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, 123, 2010, 886.

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G., A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure and Applied Chemistry**, 69, 1997, 297.

MORENO, L.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Analysis of amino acids in complex samples by using voltammetry and multivariate calibration methods. **Analytica Chimica Acta**, 507, 2004, 247.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 145 (4), 2006, 517.

NA, D. H.; YOUN, Y. S.; LEE, K. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring and optimization of site-specific PEGylation of ricin A-chain. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 18, 2004, 2185.

NARANG, U.; ANDERSON, G.P.; LIGLER, F.S.; BURANST, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, 12, 1997, 937.

NASCIMENTO, V.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, 21 (5), 1998, 614.

NICOLSON, G. L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M. E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, 13, 1974, 196.

OLIVEIRA, R. T. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; FERREIRA, V. S.; OLIVEIRA, S. C.; AVACA, L. A. Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical



preparations using boron-doped diamond electrodes. **Electroanalysis**, 19 (11), 2007, 1189.

OLIVEIRA, S. C. B.; DICULESCU, V. C.; PALLESCHI, G.; COMPAGNONE, D.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and in situ evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical DNA-biosensor. **Analytica Chimica Acta**, 588, 2007, 283.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, 55, 2010, 4599.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; DICULESCU, V. C., Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part I. Analysis in incubated solutions, **Bioelectrochemistry**, 64, 2004, 133.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; DICULESCU, V. C., Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors, **Bioelectrochemistry**, 64, 2004, 143.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Ricin. **Toxicon**, 39, 2001, 1723.

PATEL, K.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Application of boron-doped CVD-diamond film to photoelectrode. **Denki Kagaku**, 60, 1992, 659.

PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J.; BAREK, J. Boron-doped diamond film electrodes -New tool for voltammetric determination of organic substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 39, 2009, 148.

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Química Nova**, 2003, 26, 844.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and Ricinus Communis Agglutinin. **Crop Science**, 39, 1999, 353.



POLCARO, A. M.; MASCIA, M.; PALMAS, S.; VACCA, A. Electrochemical degradation of diuron and dichloroaniline at BDD electrode. **Electrochimica Acta**, 49, 2004, 649.

POLI, M. A.; RIVERA, V. R.; HEWETSON, J. F.; MERRIL, G. A. Detection of ricin by colorimetric and chemoluminescence ELISA. **Toxicon**, 32, 1994, 1371.

POVINELI, K. L.; FINARDI, F. ILHO, F. The multiple functions of plant lectins. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, 24, 2002, 135.

RAMAKRISHNAN, S.; EAGLE, M. R.; HOUSTON, L. L. Radioimmunoassay of ricin A- and B-chains applied to samples of ricin A-chain prepared by chromatofocusing and by DEAE Bio-Gel A. **Biochimica et Biophysica Acta**, 719, 1982, 341.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of amulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, 160, 2001, 739.

RAUBER, A.; HEARD, J. Castor bean toxicity re-examined: a new perspective. **Veterinary and human toxicology**, 27, 1985, 498.

RAY, S.; AHMED, H.; BASU, S.; CHATTERJEE, B. P. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus scunia*. **Carbohydrate Research**, 242, 1992, 247.

REZAEI, B.; ZARE, Z. M. Modified glassy carbon electrode with multiwall carbon nanotubes as a voltammetric sensor for determination of leucine in biological and pharmaceutical samples. **Analytical Letters**, 41 (12), 2008, 2267.

RIBEIRO, W. F. **Análise de traços do pesticida carbendazim por voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbon vítreo modificado com nanotubos de carbono**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2009.

RIBEIRO, W. F.; SELVA, T. M. G.; LOPES, I. C.; COELHO, E. C. S.; LEMOS, S. G.; ABREU, F. C. de; NASCIMENTO, V. B. do; ARAÚJO, M. C. U. de; Electroanalytical determination of carbendazim by square wave adsorptive stripping voltammetry with



a multiwalled carbon nanotubes modified electrode. **Analytical Methods**, 3, 2011,1202.

RUBINA, A. Y.; DYUKOVA, V. I.; DEMENTIEVA, E. I.; STOMAKHIN, A. A.; NESMEYANOV, V. A.; GRISHIN, E. V.; ZASEDATELEV, A. S. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. **Analytical Biochemistry**, 340, 2005, 317.

SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, 51, 2006, 4612.

SALAZAR-BANDA, G. R.; CARVALHO, A. E. de; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Journal of Applied Electrochemistry**, 40, 2010, 1817.

SANTOS, K. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, 80, 2010, 1999.

SANTOS, P. V. F.; LOPES, I. C.; DICULESCU, V. C.; ARAÚJO, M. C. U.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Redox mechanisms of Nodularin and chemically degraded Nodularin. **Electroanalysis**, 23, 2011, 1.

SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20 (2), 2009, 360.

SAVY FILHO, A. **Mamona: Tecnologia Agrícola**. Campinas (SP): EMOPI, 2005.

SEVERINO, L. S. **O Que Sabemos sobre a Torta de Mamona**. Campina Grande (PB): Embrapa Algodão, 2005. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).

SHYU, H. F.; CHIAO, D. J.; LIU, H. W.; TANG, S. S. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of ricin. **Hybrid Hybridomics**, 21, 2002, 69.



SHYU, R. H.; SHYU, H. F.; LIU, H. W.; TANG, S. S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin **Toxicon**, 40 (3), 2002, 255.

SIMÕES, M.; BARANTON, S.; COUTANCEAU, C. Electro-oxidation of glycerol at Pd based nano-catalysts for an application in alkaline fuel cells for chemicals and energy cogeneration. **Applied Catalysis B: Environmental**, 93, 2010, 354.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Princípios de análise Instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMALLSHAW, J. E.; FIRAN, A.; FULMER, J. R.; RUBACK, S. L.; GHETIE, V.; VITETTA, E. S. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. **Vaccine**, 20 (27-28), 2002, 3422.

SMITH, E. T. Examination of n=2 reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. **Analytica Chimica Acta**, 572, 2006, 259.

SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, 26, 2003, 81.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, 49, 2004, 4021.

SURESH, S.; GUPTA, A. K.; RAO, V. K.; KUMAR, Om.; VIJAYARAGHAVAN, R. Amperometric immunosensor for ricin by using on graphite and carbon nanotube paste electrodes. **Talanta**, 81, 2010, 703.

SURESH, S.; KUMAR, Om.; KOLHE, P.; RAO, V. K.; SEKHAR, K. Detection of ricin in water samples using disposable screen-printed electrodes. **Defence Science Journal**, 57 (6), 2007, 839.

TERAZAWA, K.; GRIFFITHS, G. D.; LEITH, A. G.; GREEN, M. A. Electrophoretic determination of ricin using immunogold silver staining--comparison with simple "protein dot" method. **Nihon Hoigaku Zasshi**, 43, 1989, 303.



TOLEDO, R. A. de; MAZO, L. H.; SANTOS, M. C. de; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. de; CAVALHEIRO, E. T. G. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, 28 (3), 2005, 456.

TROUILLON, R.; O'HARE, D. Comparasion of glassy carbono and boron doped Diamond electrodes: Resistance to biofouling. **Electrochimica Acta**, 55, 2010, 6586.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Solid Electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, 10, 2007, 495.

VILASECA, C.; QUINTANA, M. C.; VICENTE, J.; HERNÁNDEZ, P.; HERNÁNDEZ L. Electrochemical analysis of the alanine phenylthiohydantoin derivative by cathodic stripping voltammetry. **Analytical Biochemistry**, 379, 2008, 91.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W., **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WALL, J. S. Disulfide bonds: determination, location, and influence on molecular properties of proteins. **Agricultural and food chemistry**, 19 (4), 1971, 619.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3rd. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Ltd., 2006.

WANG, J. **Analytical Eletrochemistry**. 2^a ed. New York: John Wiley, 2000.

WANG, L.; COLE, K. D.; GAIGALAS, A. K.; ZHANG, Y. Z. Fluorescent nanometer microspheres as a reporter for sensitive detection of simulants of biological threats using multiplexed suspension arrays. **Bioconjugate Chemistry**, 16, 2005, 194.

WEIL, J. H.; **Bioquímica Geral**. 2^a Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, 47 (2), 1998, 183.



WOO, B. H.; LEE, J. T.; LEE, K. C. **Protein Expression and Purification**, 13, 1998, 150.

WU, F-H.; ZHAO, G-C.; WEI, X-W.; YANG, Z-S. Electrocatalysis of tryptophan at multi-walled carbon nanotube modified electrode. **Microchimica Acta**, 144, 2004, 243.

XU, J.; GRANGER, M. C.; CHEN, Q.; STROJEK, J. W.; LISTER, T. E.; SWAIN, G. M. Boron-doped diamond thin-film electrodes. **Analytical Chemistry News and Features**, 1997, 591A.

YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated Diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 473 (1-2), 1999, 173.

YARDIM, Y.; LEVENT, A.; KESKIN, E.; SENTÜRK, Z. Voltammetric behavior of benzo[a]pyrene at boron-doped diamond electrode: A study of its determination by adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate. **Talanta**, 85, 2011, 441.

YARDIM, Y.; SENTÜRK, Z. Voltammetric behavior of indole-3-acetic acid and kinetin at pencil-lead graphite electrode and their simultaneous determination in the presence of anionic surfactant. **Turk J. Chem.**, 35, 2011, 413.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J., Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21 (6), 1998, 787.

ZHANG, J.; OYAMA, M. Electroanalysis of myoglobin and hemoglobin with a boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, 78, 2004, 217.

ZHANG, G.; QI, Y.; TIAN, Y. Simultaneous and direct determination of tryptophan and tyrosine at boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, 18 (8), 2006, 830.

ZOSKI, C. G.; **Handbook of eletrochemistry**. 1^a Ed. Netherlands: Elsevier, 2006.

