



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

**Dissertação de Mestrado**

**Determinação voltamétrica do terapêutico  
redox-ativo Mn(III) *N*-metilpiridilporfirina  
em matriz biológica**

**Ana Carolina Vieira Mascarenhas**

João Pessoa – PB - Brasil

Julho/2017



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

## **Dissertação de Mestrado**

# **Determinação voltamétrica do terapêutico redox-ativo Mn(III) *N*-metilpiridilporfirina em matriz biológica**

**Ana Carolina Vieira Mascarenhas\***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Analítica.

**Orientador: Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos**

**2º-orientador: Prof. Dr. Julio Santos Rebouças**

**\*Bolsista CNPq**

**João Pessoa – PB - Brasil**

**Julho/2017**

M395d Mascarenhas, Ana Carolina Vieira.  
Determinação voltamétrica do terapêutico redox-ativo  
Mn(III) N-metilpiridilporfirina em matriz biológica / Ana Carolina  
Vieira Mascarenhas. - João Pessoa, 2017.  
68 f. : il. -

Orientadores: Shelan Guimarães Lemos, Julio Santos  
Rebouças.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

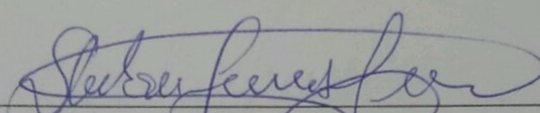
1. Química Analítica. 2. Voltametria de onda quadrada.  
3. EPCNTC. 4. ECV. 5. Mn-porfirinas. 6. Terapêutico redox  
ativo. 7. Modelos biológicos. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

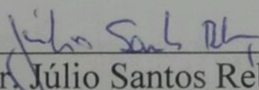
# Determinação voltamétrica do terapêutico redox-ativo Mn(III) N-metilpiridilporfirina em matriz biológica.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Ana Carolina Vieira Mascarenhas e aprovada pela banca examinadora em 28 de julho de 2017.



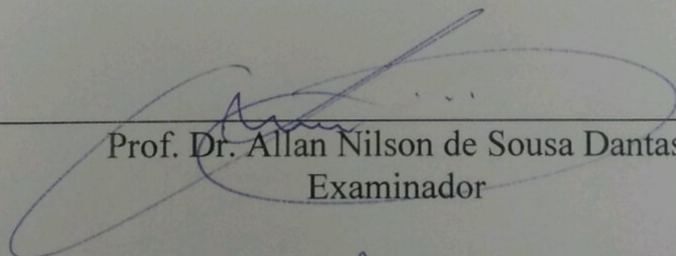
---

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos  
Orientador/Presidente



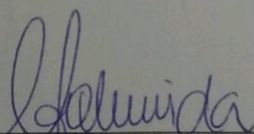
---

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças  
2º. Orientador



---

Prof. Dr. Allan Nilson de Sousa Dantas  
Examinador



---

Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida  
Examinador

**À minha mãe, Ednilza, à  
minha irmã Giovanna, ao  
meu sobrinho(a), ao meu  
eterno namorado Caio.**

**Com amor.**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me guiar e me dar força para conseguir superar todas as dificuldades.

À minha mãe, Ednilza Hojo, por nunca desistir de mim, por me aconselhar e me apoiar em todas as grandes decisões da vida, por acreditar em mim e me dar força toda vez que eu desanimava.

À minha irmã Giovanna Hojo, por ser minha melhor amiga, por sempre me apoiar e me ajudar em todos os momentos, e por me dar o presente mais lindo da minha vida.

Ao meu “paidrasto”, Tiago Panizza, que sempre me apoiou, fazendo o que estava ao seu alcance, e por cuidar bem da nossa família.

Ao meu companheiro, eterno namorado, Caio Vinicius de Lima, por estar ao meu lado em todos os momentos, por me motivar, acreditar em mim, e me inspirar para sempre melhorar e conseguir superar meus medos e limitações.

À minha família, mãe, “paidrasto”, irmã, e Caio, muito obrigada pelo amor, carinho e paciência. Vocês são meu suporte, minha vida.

À família do Caio, em especial a minha sogra Lindaura, por estar sempre presente, por nos ajudar sempre que necessário com tanto carinho e amor, e à Elaine pelo apoio e carinho.

Ao professor Sherlan Guimarães Lemos e ao professor Julio Santos Rebouças pela orientação, por sempre estarem de prontidão para ajudar e discutir sobre o trabalho, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao professor Luciano Farias de Almeida e à professora Katia Messias Bichinho pelas contribuições na etapa da pré defesa.

Aos amigos e colegas, que participam ou já participaram, do grupo de pesquisa: Alcides, Aline, Amália, Andresa, Cleilson, Dayvison, Edvaldo Elaine, Eliellson, Emmanuel, Ingrid, João Victor, Josiely, Tais, Thaine, Wanessa, Jefferson, Matheus, e professores Jailton, Sherlan e Wallace, pelas discussões nas reuniões semanais, pelas conversas e cafés no

laboratório, pelas risadas, e pela colaboração que cada um deu, direto ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

À Amália pelo suporte que me deu desde os primeiros dias em João Pessoa, e a seu esposo Osmundo.

À Thaine por me ajudar no desenvolvimento no trabalho, e pela amizade desenvolvida.

À Tais, pela amizade, caronas e risadas.

Ao professor Wallace e sua esposa Mary, pela amizade, pelas conversas e momento de diversão.

Aos amigos e colegas do DQ-UFPB, em especial, Anne Caroline, Bárbara, Clarissa, Cristiano, Daniella, Dariston, Elaine, Ferreira, Flaviana, Geórgia, Iran, Israel, Jacqueline, Jandeilson, Katharinne, Kelly, Marília Gabriela, Matheus, Paulo, Rômulo, Stephanie, Vitor Hugo, Yolanda pelas conversas, conselhos, e pelos momentos de descontração.

Ao Cristiano que me ajudou muito no desenvolvimento do trabalho e compartilhou a angústia dos momentos finais.

Aos amigos que João Pessoa me deu: Sema e Marcão, Neto e Lívia, muito obrigada pelas conversas, por nos apresentarem um pouco da cultura dessa cidade maravilhosa, pela capoeira, e pelos sobrinhos de quatro patas, Macarena e Odin; Josi e Rafa, que desde os primeiros dias em Joao Pessoa nos ajudaram em momentos difíceis e compartilharam momentos de muita felicidade, dentro e fora do laboratório; Jacqueline, Anderson e Jannaira pelas tardes de jogos, pela ajuda com o trabalho de mestrado e projeto de doutorado, pelos aniversários comemorados; muito obrigado pela amizade de vocês, por terem acolhido a mim e a Caio com tanto carinho, vocês são como família para nós.

À Valdete e Sofia, pelo carinho e pelo apoio na fase final dessa dissertação.

Às minhas amigas de vida, Bel, Aninha, Nayara, Thaisa, Camila, que mesmo distantes participaram dessa etapa da minha vida, e irão participar das outras que estão só começando.

Ao CNPq e PPGQ-UFPB pela bolsa concedida.

## RESUMO

As Mn-porfirinas pentacatiônicas (MnP) derivadas das 2-*N*-piridilporfirinas têm se destacado como mímicos potentes das enzimas superóxido dismutase e moduladores redox catalíticos de estresse oxidativo, com alguns compostos já em testes clínicos de fase I/II no Canadá e EUA como um terapêutico redox ativo. O efeito *in vivo* das MnPs depende não apenas de sua eficiência catalítica, mas também de fatores como biodisponibilidade, acúmulo celular, entre outros. A quantificação de MnP em matriz biológica demanda técnicas analíticas precisas e sensíveis. No presente trabalho foi desenvolvido um método voltamétrico para a quantificação da MnP típica, *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatomangans(III) (MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>), usando biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para amostras biológicas. As medidas voltamétricas foram realizadas empregando um eletrodo de referência de Ag/AgCl e um eletrodo auxiliar de platina, em solução de tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,8) e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Para o desenvolvimento do método, as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e onda quadrada (VOQ) foram avaliadas, sendo a voltametria de onda quadrada a que se mostrou mais sensível ao analito. Como eletrodo de trabalho foram avaliados quatro tipos de eletrodo à base de carbono, eletrodo de carbono vítreo (ECV), eletrodo de pasta de carbono (EPC), eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (ENTC), e eletrodo de pasta de carbono e nanotubos de carbono (EPCNTC). O eletrodo de pasta de carbono e nanotubos de carbono apresentou maior sensibilidade, porém o eletrodo de carbono vítreo apresentou uma maior seletividade. Sendo assim, o método foi desenvolvido empregando os dois eletrodos de trabalho. Os parâmetros da VOQ foram otimizados e as curvas analíticas obtidas com os dois eletrodos apresentaram região linear de 0,04 a 0,11 μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. Foram estimados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o ECV foram de 19 nmol L<sup>-1</sup> e 64 nmol L<sup>-1</sup>, e para o EPCNTC foram de 1,6 nmol L<sup>-1</sup> e 5,4 nmol L<sup>-1</sup> respectivamente. O método desenvolvido apresentou exatidão aceitável, tendo porcentagens de recuperação aparente entre 110% e 117% em amostras de biomassa fúngica crescida na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. Concentrações de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> entre 0,08 - 0,12 μmol mg<sup>-1</sup> foram encontradas nas amostras de biomassa fúngica crescidas por 72 horas em meio YMA contendo 20 μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Palavras-chave: Voltametria de onda quadrada, EPCNTC, ECV, Mn-porfirinas, terapêutico redox ativo, modelos biológicos.

## ABSTRACT

Cationic Mn porphyrins (MnPs) derived from 2-N-pyridylporphyrins are among the most potent superoxide dismutase (SOD) mimics and catalytic redox modulators of oxidative stress for pre-clinical studies and are currently under phases I/II Clinical Trials in Canada and USA as redox-active therapeutics. The activity of MnPs in vivo depends not only on their intrinsic catalytic potency, but also on other factors, such as cell accumulation and bioavailability. The quantification of MnPs in biological milieu demands reliable and sensitive analytical techniques. In the present work a voltammetric method for quantification of the prototypical MnP, meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin (MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>) was developed using yeast *Saccharomyces cerevisiae* biomass as a model for biological samples. The voltammetric measurements were carried out using Ag/AgCl electrode and platinum electrode as reference and auxiliary electrodes, respectively, in 0.05 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaCl. For the development of the method, differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) techniques were evaluated, with SWV being the most sensitive to the analyte. As working electrode, four types of carbon-based electrodes were evaluated: glassy carbon electrode (GCE), carbon paste electrode (CPE), carbon nanotube paste electrode (CNTPE), and carbon nanotube and carbon paste electrode (CNTCPE). The CNTCPE was the most sensitive whereas GCE was the most selective. Therefore, CNTCPE and GCE were used as working electrodes for method development. SWV parameters were optimized and the obtained analytical curve for both electrodes showed a linear region from 0.04 to 0.11 μmol L<sup>-1</sup> of MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. The limit of detection (LD) and the limit of quantification (LQ) were 19 nmol L<sup>-1</sup> and 64 nmol L<sup>-1</sup> for GCE, and 1.6 nmol L<sup>-1</sup> and 5.4 nmol L<sup>-1</sup> for CNTCPE, respectively. The method developed presented acceptable accuracy, with percentages of apparent recovery from 110% to 117% in MnP-spiked yeast biomass sample grown in the absence of MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. Concentrations of MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> from 0.08 to 0.12 μmol mg<sup>-1</sup> were found in yeast biomass sample grown for 72 hours in YMA medium containing 20 μmol L<sup>-1</sup> of MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Key words: Square wave voltammetry, CNTCPE, GCE, Mn-porphyrins, redox-active therapeutics, biological models.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do anel porfirínico indicando as posições dos substituintes $\beta$ -pirrólicos e meso do anel porfirínico. Fonte: elaborada pelo autor. ....	2
Figura 2 - Representação das etapas envolvidas na reação de desproporcionamento do íon radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) catalisado pela SOD e pela MnP. Adaptado: BATINIĆ-HABERLE et al., 2015. ....	2
Figura 3 - Representação estrutural das Mn(III) 2-N-alkilpridilporfirinas, MnTalquil-2-PyP <sup>5+</sup> , sendo R geralmente um alceno linear. Fonte: Elaborada pelo autor. ....	3
Figura 4 – Relação entre a estrutura das Mn-porfirinas neutras, aniônicas e catiônicas com seus respectivos $E_{1/2}$ e $\log k_{cat}$ . Adaptado BATINIĆ-HABERLE et al., 2015. ....	4
Figura 5 - Esquema das fases de estudos pré-clínicos para avaliar o desempenho terapêutico das MnP. Adaptado: BATINIĆ-HABERLE et al., 2011. ....	6
Figura 6 - Representação das Mn-porfirinas pentacatiônicas que estão em estudos clínicos para proteção de células saudáveis. Fonte: Elaborada pelo autor. ....	7
Figura 7 – (a) Aplicação do potencial para a voltametria cíclica, (b) voltamograma cíclico para um sistema reversível. Adaptado: WANG, 2006. ....	9
Figura 8 - (a) Representação do funcionamento da técnica de voltametria de pulso diferencial e (b) voltamograma de pulso diferencial (PACHECO et al., 2013). ....	11
Figura 9 - Representação esquemática do funcionamento da técnica de voltametria de onda quadrada (DAUPHIN-DUCHARME et al., 2017). a: amplitude de pulso, f: frequência; $E_s$ : incremento de pulso, $I_d$ : corrente no sentido direto, $I_i$ : corrente no sentido inverso. ....	12
Figura 10 - Voltamogramas de onda quadrada. Perfis voltamétricos teóricos para (a) sistema totalmente reversível e (b) sistema totalmente irreversível (SOUZA et al., 2003). ....	13
Figura 11 – Erlenmeyers contendo a solução de meio de cultura YMA líquido com 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> (esquerda) e na ausência de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> (direita). ....	17
Figura 12- Esquema das etapas de preparo da amostra de biomassa fúngica. ....	18
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos em solução de $1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$ de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol $L^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol $L^{-1}$ ; $v = 100$ mV $s^{-1}$ . ....	23
Figura 14 - Voltamograma cíclico em solução de $1 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$ de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol $L^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol $L^{-1}$ ; $v = 100$ mV $s^{-1}$ . (1) pico anódico e (2) pico catódico. ....	24

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos em solução de $1 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; velocidade de varredura variando de 5 a 200 mV s <sup>-1</sup> .....	25
Figura 16 - Variação das correntes de pico anódica (quadrados) e catódica (círculos) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura. ....	26
Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada e pulso diferencial obtidos em solução de 1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . ....	28
Figura 18 - Componentes do voltamograma de onda quadrada obtido em solução de 0,1 mmol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $\Delta E_s = 5$ mV, $a = 20$ mV e $f = 25$ s <sup>-1</sup> . ....	28
Figura 19 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de $1 \times 10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com diferentes eletrodos de trabalho, em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $\Delta E_s = 5$ mV, $a = 20$ mV e $f = 25$ s <sup>-1</sup> . ....	29
Figura 20 - Estudo da variação do incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ); (a) voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $a = 20$ mV; $f = 25$ Hz; (b) relação entre as $I_p$ e os $\Delta E_s$ .....	31
Figura 21 - Estudo da variação do incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ); (a) voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> com EPCNTC em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $a = 20$ mV; $f = 25$ Hz; (b) relação entre as $I_p$ e os $\Delta E_s$ .....	32
Figura 22 - Estudo da variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando (a) ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $a = 20$ mV; $\Delta E_s = 7$ mV e (b) relação entre as $I_p$ e as frequências.....	33
Figura 23 - Estudo da variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando (a) EPCNTC em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; $a = 20$ mV; $\Delta E_s = 5$ mV e (b) relação entre as $I_p$ e as frequências.....	33
Figura 24 - Estudo da variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando (a) ECV em tampão fosfato 0,05 mol	

L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; ΔE <sub>s</sub> = 7 mV, f = 20 Hz e (b) relação entre as I <sub>p</sub> e as amplitudes.....	34
Figura 25 - Estudo da variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de 0,1 μmol L <sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando (a) EPCNTC em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; ΔE <sub>s</sub> = 5 mV, f = 100 Hz e (b) relação entre as I <sub>p</sub> e as amplitudes.....	34
Figura 26 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para sucessivas adições de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , com ΔE <sub>s</sub> = 7 mV, f = 20 Hz e a = 75 mV. ....	36
Figura 27 - Curvas analíticas obtidas através das correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada na faixa linear de (a) 0,04 μmol L <sup>-1</sup> a 0,11 μmol L <sup>-1</sup> e (b) 0,3 μmol L <sup>-1</sup> a 7,93 μmol L <sup>-1</sup> , utilizando ECV, em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; ΔE <sub>i</sub> = 7 mV, f = 75 Hz e a = 75 mV. ....	36
Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada para sucessivas adições de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> utilizando EPCNTC em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; ΔE <sub>s</sub> = 5 mV, f = 75 Hz, a = 50 mV.....	37
Figura 29 - Curva analítica obtida através das correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada na faixa linear de 0,04 μmol L <sup>-1</sup> a 0,11 μmol L <sup>-1</sup> utilizando EPCNTC em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; ΔE <sub>s</sub> = 5 mV, f = 75 Hz e a = 50 mV.....	38
Figura 30 – Biomassas resultantes após 72 horas de crescimento em meio YMA líquido com 20 μmol L <sup>-1</sup> MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> (esquerda) e na ausência de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> (direita).....	41
Figura 31 – Voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curva de adição de padrão para determinação de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> em amostra de biomassa fúngica fortificada com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> , com (a) e (b) EPCNTC, (c) e (d) ECV em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . ....	42
Figura 32 - Voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de adição de padrão para determinação de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> em alíquotas da biomassa fúngica crescida com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> , analisada empregando EPCNTC (a, b, c, d), e ECV (e, f) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . ....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos eletrodos de trabalho em % m m <sup>-1</sup> . .....	19
Tabela 2 - Equações da ANOVA para um modelo de regressão (MONTGOMERY, 2013)...	21
Tabela 3 - Parâmetros otimizados da técnica de voltametria de onda quadrada. ....	35
Tabela 4. Dados das equações das curvas analíticas obtidas com o ECV.....	37
Tabela 5 - Dados da equação da reta obtida para a faixa linear de concentração da curva analíticas realizada com o EPCNTC. ....	38
Tabela 6 - Resultados da análise de variância para as curvas analíticas obtida com o ECV e com o EPCNTC, na faixa linear de 0,04 µmol L <sup>-1</sup> a 0,11 µmol L <sup>-1</sup> . ....	39
Tabela 7 - Limites de detecção obtidos para o ECV e EPCNTC. ....	40
Tabela 8 – Equações da reta referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa fortificadas com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> .....	43
Tabela 9 – Resultados dos ensaios de recuperação aparente para análise de amostras de biomassa crescida na ausência de MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> e fortificadas com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> .....	43
Tabela 10- Equações da reta referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa crescidas com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> .....	45
Tabela 11 – Resultados dos ensaios para análise de amostras de biomassa crescida com MnTM-2-PyP <sup>5+</sup> .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Amplitude
<b><math>E_{1/2}</math></b>	Potencial de meia onda
<b><math>E_f</math></b>	Potencial final
<b><math>E_i</math></b>	Potencial inicial
<b><math>E_v</math></b>	Potencial de inversão
<b>ECV</b>	Eletrodo de carbono vítreo
<b>ENTC</b>	Eletrodo de nanotubos de carbono
<b>EPC</b>	Eletrodo de pasta de carbono
<b>EPCNTC</b>	Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono
<b>ERRO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>F</b>	Frequência
<b>HPLC-FLD</b>	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
<b>HPLC-MS/MS</b>	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por massa/massa
<b><math>I_{pa}</math></b>	Corrente de pico anódico
<b><math>I_{pa}/I_{pc}</math></b>	Razão da corrente de pico anódico e catódico
<b><math>I_{pc}</math></b>	Corrente de pico catódico
<b><math>k_{cat}</math></b>	Constante catalítica
<b>LD</b>	Limite de detecção

<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MnP</b>	Manganês-porfirina pentacatiônicas
<b>MnTM-2-PyP<sup>5+</sup></b>	<i>meso</i> -tetraquis( <i>N</i> -metilpiridínio-2-il)porfirinato manganês(III)
<b>NHE</b>	Eletrodo normal de hidrogênio
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>UV/vis</b>	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>VOQ</b>	Voltametria de onda quadrada
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>YMA</b>	Meio de cultura levedura malte ágar
<b><math>\Delta E_p</math></b>	Diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico
<b><math>\Delta E_s</math></b>	Incremento de potencial

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b><i>i</i></b>
<b>ABSTRACT</b>	<b><i>ii</i></b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b><i>vi</i></b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b><i>vii</i></b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.1 Porfirinas de manganês como moduladores redox</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.2 Técnicas voltamétricas</b>	<b><i>9</i></b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b><i>14</i></b>
<b>3 EXPERIMENTAL</b>	<b><i>15</i></b>
<b>3.1 Reagentes e soluções</b>	<b><i>15</i></b>
<b>3.2 Obtenção e preparo das amostras</b>	<b><i>16</i></b>
<b>3.3 Célula eletroquímica e eletrodos</b>	<b><i>18</i></b>
<b>3.4 Procedimento experimental</b>	<b><i>19</i></b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b><i>23</i></b>
<b>4.1 Comportamento eletroquímico da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup></b>	<b><i>23</i></b>
<b>4.2 Desenvolvimento da metodologia de quantificação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup></b>	<b><i>27</i></b>
4.2.1. Avaliação das técnicas voltamétricas de pulso	<i>27</i>
4.2.2. Avaliação dos eletrodos de trabalho	<i>29</i>
4.2.3. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	<i>30</i>
4.2.4. Curvas analíticas	<i>35</i>
4.2.5. Aplicação do método em amostras de biomassa fúngica	<i>40</i>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b><i>46</i></b>
<b>5.1 Perspectivas futuras</b>	<b><i>46</i></b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b><i>48</i></b>

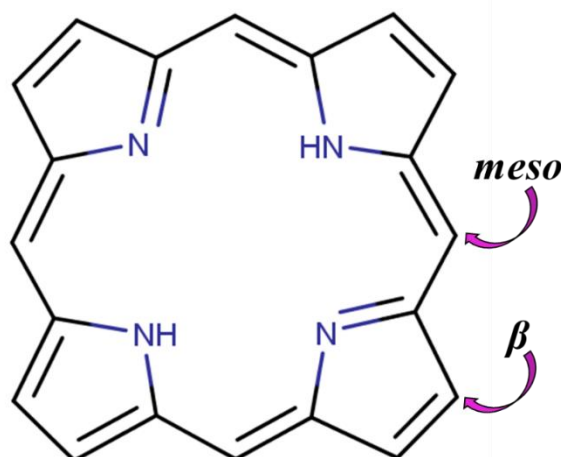
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Porfirinas de manganês como moduladores redox

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e as vias protetoras antioxidantes (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2016). O acúmulo de ERO e ERN pode causar danos oxidativos em moléculas biológicas associados a várias condições fisiopatológicas, entre elas alguns tipos de câncer, diabetes, processos de isquemia/reperfusão, e algumas doenças relacionadas com o sistema nervoso central (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010). Em muitos casos, o estresse oxidativo se deve à inativação ou baixa expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), enzima responsável pelo controle *in vivo* dos níveis do íon radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (RAJIC *et al.*, 2012).

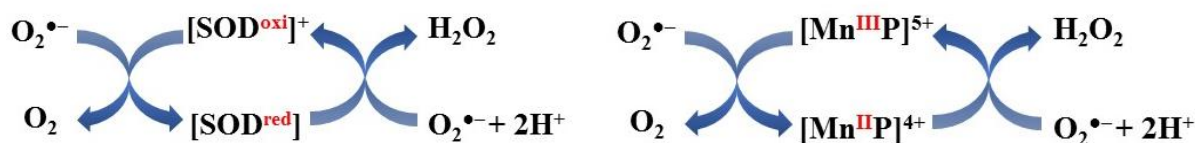
Os primeiros estudos sobre modelos sintéticos da SOD empregando as porfirinas, foram realizados com Fe-porfirinas, inicialmente por Pastenack e Halliwell (1979). O campo permaneceu dormente por mais de uma década (FAULKNER *et al.*, 1994), tendo se intensificado apenas por volta dos anos 2000, com os estudos empregando as Mn-porfirinas (MnP) como mímicos SOD potentes (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2016). As principais características buscadas para os mímicos SOD eram a de compostos com pequeno volume molecular e capacidade de atravessar a membrana celular, podendo assim ter excelente desempenho terapêutico e evitar os problemas típicos de utilização de enzimas naturais (alto custo de isolamento, purificação e armazenamento, baixa estabilidade, biodisponibilidade comprometida).

As porfirinas são uma classe de compostos que possuem um macrociclo terapirrólico altamente conjugado (Figura 1). O anel porfirínico é um ligante tetradentado no qual, após a dissociação dos dois hidrogênios ácidos dos átomos de nitrogênio do pirrol, um metal pode se coordenar dando origem às metaloporfirinas. Além de ser um sistema muito estável, o anel porfirínico possui uma química acessível, com a possibilidade de modificação de sua estrutura por substituintes na posição *meso* e  $\beta$ -pirrólicos do anel porfirínico.



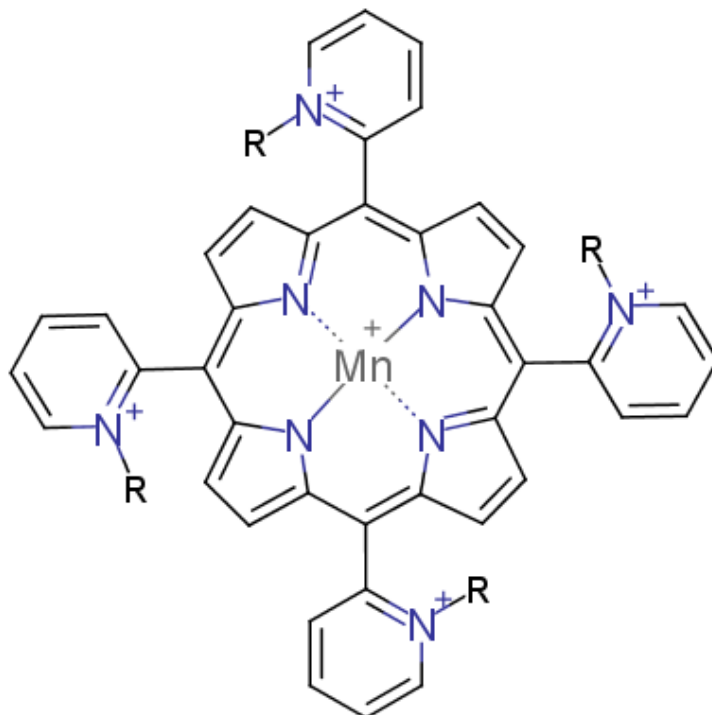
**Figura 1-** Estrutura do anel porfirínico indicando as posições dos substituintes  $\beta$ -pirrólicos e *meso* do anel porfirínico. Fonte: elaborada pelo autor.

As MnPs podem catalisar a reação de desproporcionamento do  $O_2^{\bullet-}$  a oxigênio e peróxido de hidrogênio, através de um mecanismo redox semelhante àquele da enzima SOD (Figura 2). De modo geral, a reação de desproporcionamento do  $O_2^{\bullet-}$  catalisada pela SOD ou pela MnP ocorre em duas etapas, a primeira baseada na redução do centro metálico pelo  $O_2^{\bullet-}$  com formação do  $O_2$ , e a segunda baseada na oxidação do centro metálico por outra espécie  $O_2^{\bullet-}$ , retornando o catalisador à forma inicial, com conseqüente formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2015; TOVMASYAN *et al.*, 2013). O controle da natureza e distribuição de cargas dos substituintes das MnP resulta em complexos com potencial de redução Mn(III)/Mn(II) muito próximo ao das SOD ( $E_{1/2}$  das SOD é 300 mV vs. NHE) e com facilitação eletrostática semelhante àquela das SOD, levando a constantes catalíticas similares às das enzimas SOD nativas ( $\log k_{cat}$  da SOD sendo aproximadamente 9).

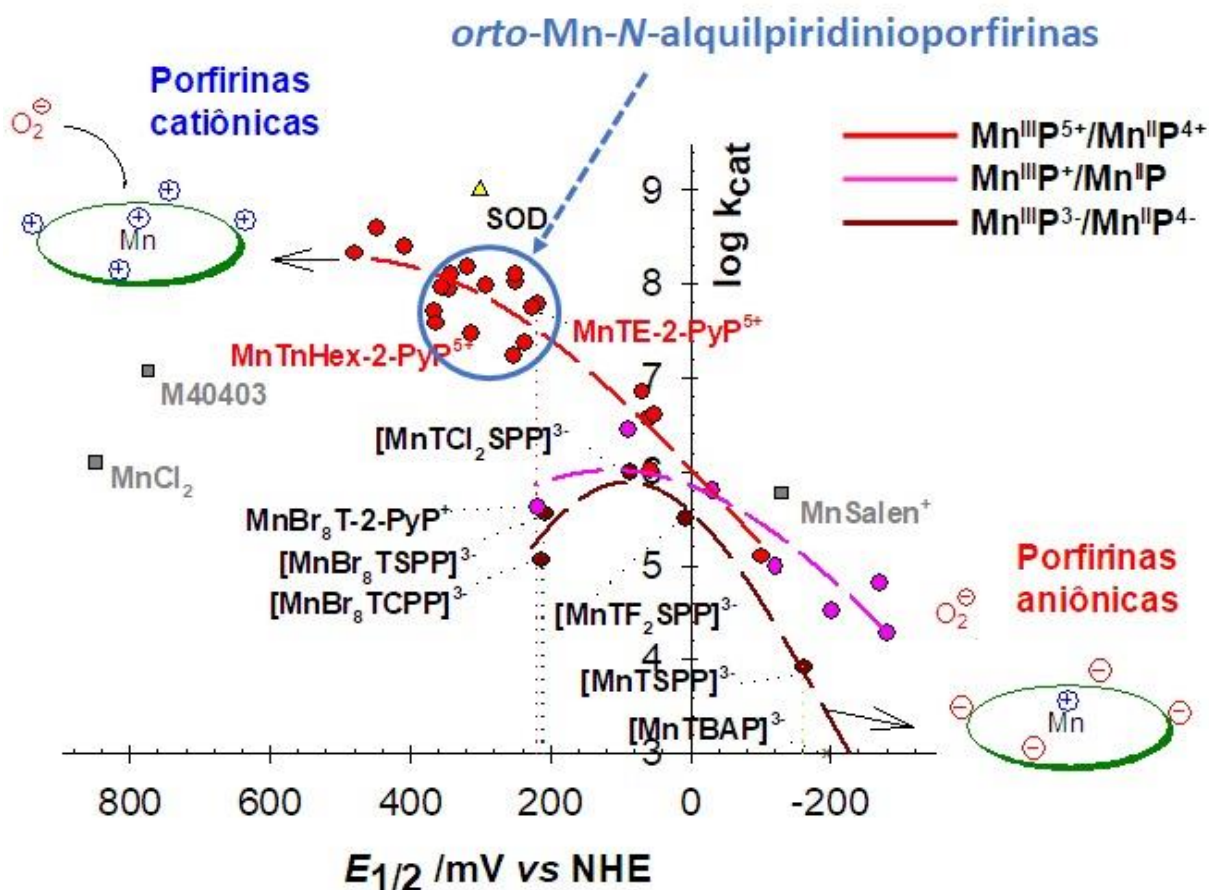


**Figura 2** - Representação das etapas envolvidas na reação de desproporcionamento do íon radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) catalisado pela SOD e pela MnP. Adaptado: BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2015.

Nos últimos anos, as porfirinas pentacatiônicas de Mn(III) têm se destacado como uma das classes de moduladores redox mais importantes (RAJIC *et al.*, 2017), atuando como mímicos da SOD, e também como catalisadores para a eliminação do peroxonitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). As MnPs pentacatiônicas *orto* substituídas (Figura 3) se destacam por possuírem cargas positivas permanentes sobre os átomos de nitrogênio do anel piridínico. O efeito retirador de elétrons dos grupos piridínicos sobre o centro metálico está diretamente relacionado com os valores de  $E_{1/2}$  dos complexos (de 200 mV a 300 mV vs. NHE) próximos ao da SOD (Figura 4) (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2016). Além disso, as cargas positivas destes complexos orientam o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para o centro metálico da MnP, imitando o efeito de direcionamento eletrostático observado nas enzimas SOD (REBOUÇAS, *et al.*, 2008a), aumentando, assim, a eficiência dessas MnPs como mímicos SOD. Essas Mn-porfirinas vêm sendo empregadas em estudos pré-clínicos em modelos animais e unicelulares, apresentando potencial terapêutico para doenças relacionadas ao estresse oxidativo (REBOUÇAS *et al.*, 2008a; SPASOJEVIĆ *et al.*, 2008).



**Figura 3** - Representação estrutural das Mn(III) 2-N-alkilpiridilporfirinas, MnTalquil-2-PyP<sup>5+</sup>, sendo R geralmente um alceno linear. Fonte: Elaborada pelo autor.



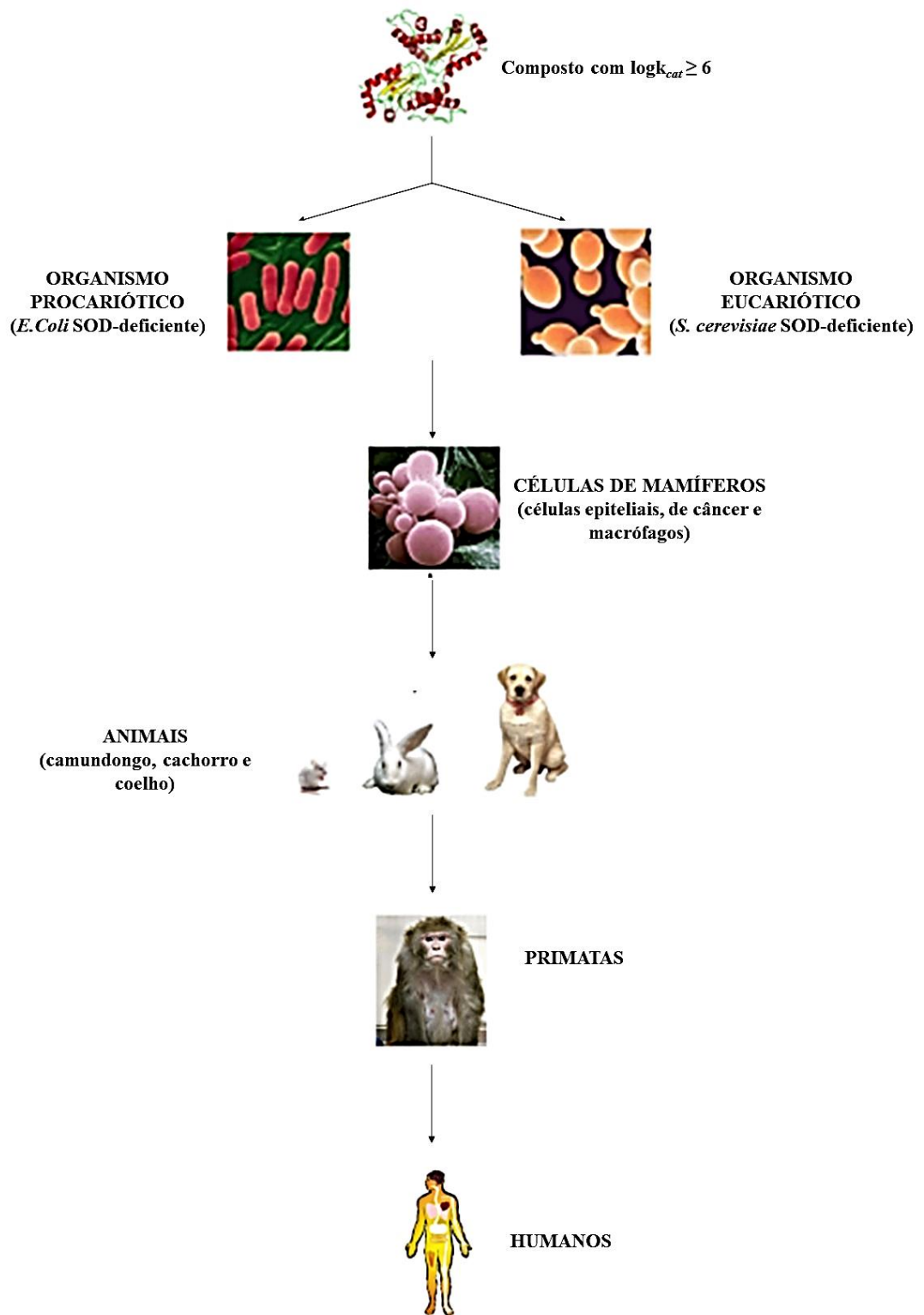
**Figura 4** – Relação entre a estrutura das Mn-porfirinas neutras, aniônicas e catiônicas com seus respectivos  $E_{1/2}$  e  $\log k_{cat}$ . Adaptado BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2015.

No desenvolvimento de um novo fármaco, os estudos dos processos evolutivos do reconhecimento molecular da nova droga, em sistemas biológicos, assumem grande importância pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades farmacológicas como potência, afinidade e seletividade (GUIDE, 2010). Estes estudos são feitos em organismos vivos, desde os mais simples aos mais complexos, tendo papel fundamental na compreensão dos processos biológicos que são desencadeados pelo novo fármaco, visto que muitos aspectos biológicos dos organismos vivos são similares (KUHNLEIN 2010, TANG 2015.). Os organismos vivos estudados são comumente denominados de organismos modelo (ou modelos biológicos), devido a cada um deles apresentar uma ou mais características que os tornam aptos para estudos laboratoriais.

Alguns dos modelos biológicos mais comumente explorados são a *Escherichia coli* (*E. coli*) e a *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), que, por exemplo, podem ser aplicados nos estudos de fármacos redox ativos como as Mn-porfirinas. Modificações genéticas específicas tornam estes modelos biológicos SOD deficientes, possibilitando assim avaliar o desempenho das Mn-porfirinas como mímico *in vivo* das enzimas SOD na remediação do estresse oxidativo, através de modelos simples de crescimento desses modelos (BATINIC-HABERLE 2010 e 2011).

O desenvolvimento de terapêuticos redox-ativos à base de MnP para uso clínico tem seguido uma série de etapas de avaliações *in vivo* que incluem estudos pré-clínicos em microrganismos unicelulares e animais superiores, antes de estudos clínicos em humanos (Figura 5). Os modelos unicelulares de bactérias e leveduras, tais como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em SOD, são aplicados para caracterizar a eficiência, biodisponibilidade e toxicidade celular das MnPs como moduladores redox, precedendo os estudos de eficiência, biodistribuição e farmacocinética em modelos experimentais em mamíferos. Em geral, as MnPs que apresentam desempenho satisfatório nos modelos unicelulares têm se mostrado eficazes em modelos pré-clínicos mais complexos (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2011). A última etapa da avaliação compreende os estudos clínicos em humanos.

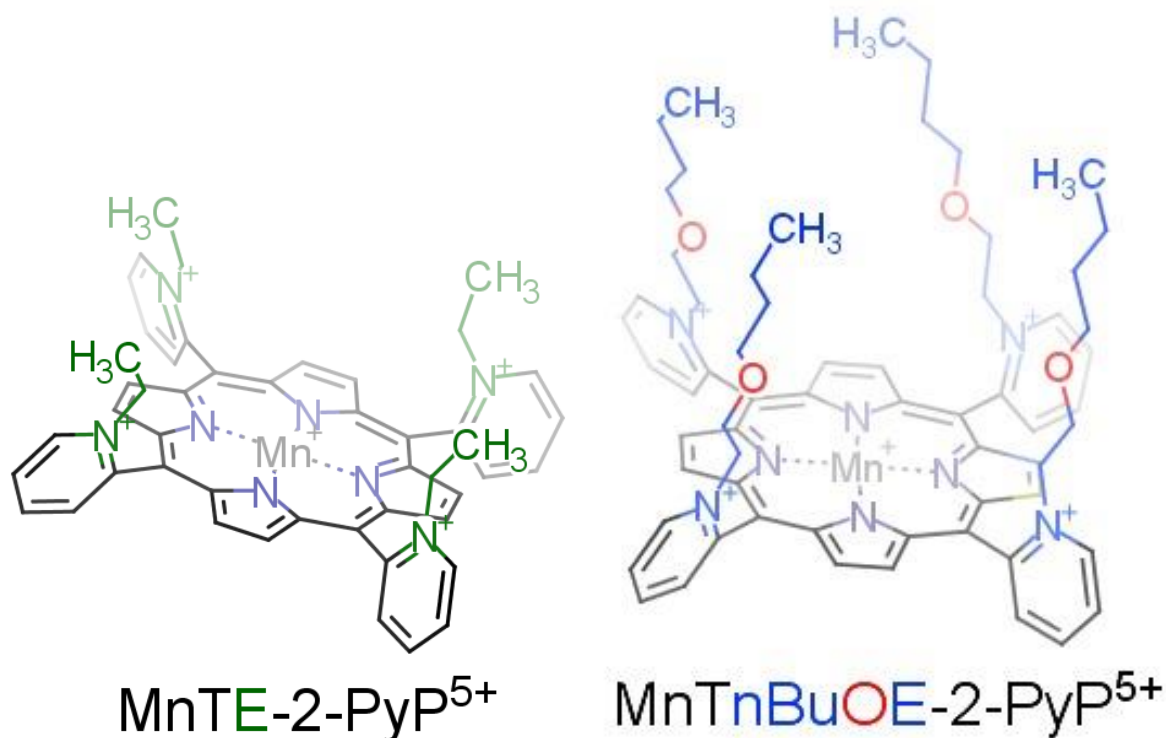
Os estudos clínicos são divididos em uma série de fases (fases I, II, III e IV), onde a fase I consiste da aplicação do novo fármaco em um grupo pequeno de voluntário, de 10 a 30 indivíduos, geralmente saudáveis. Já a fase II abrange um número maior de voluntários (70 a 100 indivíduos) que possuem a doença que será tratada. Estas fases, possuem como objetivo principal, avaliar a segurança e toxicidade de um medicamento em investigação (DRAGALIN, 2010; World Health Organization, 1995). A fase III abrange um número maior de pacientes, de 100 a 1000 indivíduos, que são divididos em dois grupos, de maneira randômica: um controle e um investigacional. Esta fase tem como principal objetivo comparar o novo tratamento com um tratamento padrão existente (SBPPC, 2017). Na fase IV, estudos são realizados para confirmar se os resultados obtidos da fase III são aplicáveis em uma grande parte da população doente, permitindo acompanhar os efeitos do medicamento a longo prazo.



**Figura 5** - Esquema das fases de estudos pré-clínicos para avaliar o desempenho terapêutico das MnP. Adaptado: BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2011.

Os efeitos terapêuticos das MnP são intensamente estudados utilizando modelos biológicos, apresentando resultados muito satisfatórios, que comprovam o potencial terapêutico das MnP (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2011). Em modelos celulares, a MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> apresentou efeitos animadores em modelos experimentais de doença de Alzheimer's (SOMPOL *et al.*, 2008) e quando empregada na quimioterapia para tratamento de câncer (YE *et al.*, 2011, JARAMILLO *et al.*, 2009, TIAN *et al.*, 2010). Em modelos animais (mamíferos) a MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>, apresentou boa atividade terapêutica no tratamento de derrames (SHENG *et al.*, 2011, SHENG *et al.*, 2002), diabetes (PIGANELLI *et al.*, 2002, BOTTINO *et al.*, 2004), câncer de pele (ZHAO *et al.*, 2005), e na radioproteção de olhos (MAO *et al.*, 2009)

Algumas MnP se destacam por sua capacidade terapêutica e já estão em fase de estudos clínicos. A MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> e a MnTnBuOE-2-PyP<sup>5+</sup> (Figura 6) encontram-se em estudo clínico nas fases I/II no Canadá e nos EUA. A MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> está sendo aplicada na proteção de ilhotas pancreáticas durante transplantes em pacientes com diabetes, enquanto a MnTnBuOE-2-PyP<sup>5+</sup> está sendo investigada no tratamento de gliomas (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2015).



**Figura 6** - Representação das Mn-porfirinas pentacatiônicas que estão em estudos clínicos para proteção de células saudáveis. Fonte: Elaborada pelo autor.

A potencialidade terapêutica das MnP depende não somente da atividade SOD intrínseca do complexo, mas especialmente da biodisponibilidade, da farmacocinética e do acúmulo *in vivo* desses complexos. Para a obtenção de informações sobre o acúmulo *in vivo* das MnPs, alguns métodos de determinação de MnP em matrizes biológicas são encontrados, onde as técnicas mais empregadas são HPLC-MS/MS e HPLC-FLD. Spasojević e colaboradores (2008) determinaram o acúmulo da MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> em tecidos de órgão de rato, por HPLC-MS/MS e HPLC-FLD, obtendo limites de detecção de 0,0005 e 0,0013  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Porém, o preparo de amostras para este tipo de aplicação requer uma série de etapas de homogeneização de tecidos, remoção de proteínas e componentes celulares e pré-concentração, o que torna o procedimento analítico muito laborioso. Adicionalmente, no caso da fluorescência, é necessária uma etapa de troca redutiva de centro metálico de Mn(III) para Zn(II), uma vez que as Mn(III)-porfirinas, ao contrário daquelas de Zn(II), não são fluorescentes (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2008).

Alternativamente a estas técnicas, a espectroscopia de absorção no UV-Vis pode ser empregada para a quantificação das MnP, visto que estes compostos são bons agentes cromóforos. Porém os limites de detecção obtidos são maiores que os obtidos pelas técnicas de HPLC-MS/MS e HPLC-FLD. Kos e colaboradores (2009) avaliaram o acúmulo de MnP em frações citosólicas e de membrana de *E. coli* deficientes em SOD, utilizando UV-Vis. Os níveis de MnP foram quantificados utilizando curvas analíticas para os isômeros *orto* e *meta* de Mn(III) *N*-alquilpiridilporfirinas, através da relação entre a área da banda Soret ( $\lambda_{\text{max}} \sim 460$  nm) e a concentração da MnP, obtendo um limite de detecção estimado de 0,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (KOS *et al.*, 2009).

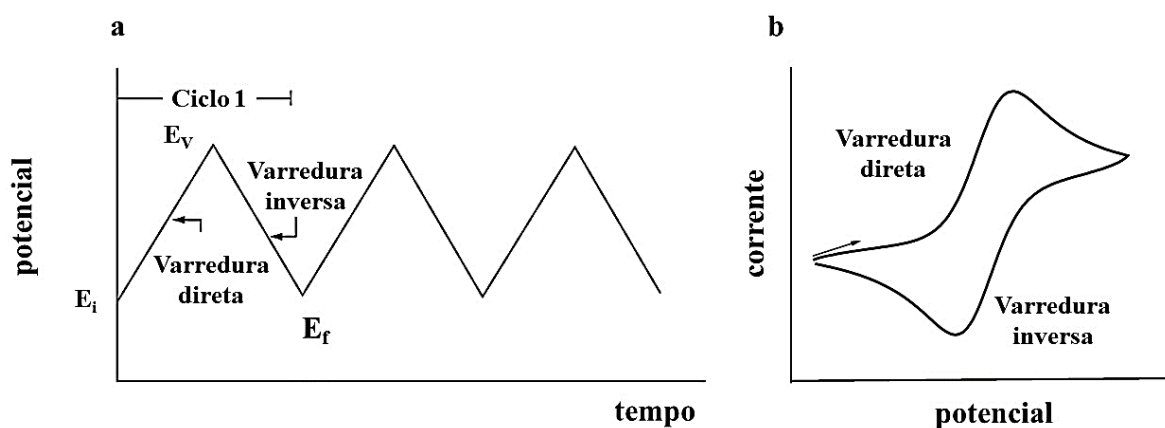
Considerando as características da rota analítica laboriosa, quando empregados HPLC-MS/MS e HPLC-FLD (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2008), bem como a baixa sensibilidade dos métodos empregando espectroscopia no UV-Vis, conclui-se que o desenvolvimento de métodos sensíveis e de procedimentos analíticos mais simples para determinação de MnP em matrizes biológicas pode trazer significativa contribuição às pesquisas relacionadas às Mn-porfirinas e suas aplicações. Uma vez que as MnP são eletroativas, as técnicas eletroanalíticas se constituem opções relevantes, pois são sensíveis e permitem a análise direta das amostras, sem a necessidade de um tratamento ou separação prévia, minimizando o tempo e gastos com as análises (GALLI *et al.* 2006). A voltametria de onda quadrada (VOQ) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) são as técnicas voltamétricas de pulso que mais se destacam em

eletroanalítica, e são amplamente empregadas na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG, 2005).

## 1.2 Técnicas voltamétricas

As técnicas voltamétricas se baseiam na medida da corrente em uma célula eletroquímica em função do tempo do potencial aplicado, e são amplamente empregadas para estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios (SKOOG, 2005).

A voltametria cíclica (VC) é a técnica eletroquímica mais utilizada para a obtenção de informações qualitativas sobre processos de oxidação e redução (WANG, 2006). Na VC, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia continuamente com o tempo na forma de onda triangular (Figura 7a), partindo de um valor de potencial inicial ( $E_i$ ), seguindo até um valor de potencial de inversão ( $E_v$ ). Ao alcançar  $E_v$  a direção da varredura é invertida, e o caminho inverso é percorrido até chegar em um valor de potencial final ( $E_f$ ), que geralmente é o mesmo que o  $E_i$  (SKOOG, 2005). O sinal de corrente registrada dá origem ao voltamograma, curva de potencial *vs.* corrente (Figura 7b). As correntes de pico de oxidação ou de redução obtidas no voltamograma são proporcionais à concentração da espécie.



**Figura 7** – (a) Aplicação do potencial para a voltametria cíclica, (b) voltamograma cíclico para um sistema reversível. Adaptado: WANG, 2006.

A avaliação da influência da variação da velocidade de varredura no perfil do voltamograma cíclico é comumente estudada para se obterem parâmetros cinéticos e de

reversibilidade do sistema eletroquímico. Para sistemas reversíveis algumas condições devem ser obedecidas (BARD & FAULKNER, 1980):

- A variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura deve ser linear;
- Diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ) deve se manter constante com o aumento da velocidade de varredura;
- Razão da corrente de pico anódico e catódico ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) deve ser igual ou próxima à unidade, independente da velocidade de varredura.

Apesar de a VC também ser empregada para análises quantitativas, os limites de detecção obtidos não são satisfatórios quando comparados com os obtidos pelas técnicas voltamétricas de pulso.

As técnicas voltamétricas de pulso são baseadas na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso. A corrente medida possui características que estão relacionadas com a altura do pulso de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico (OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985). Estas técnicas se originaram em um contexto polarográfico clássico e foram desenvolvidas como forma de sincronizar os pulsos aplicados com a formação e desprendimento das gotas de mercúrio, no eletrodo gotejante de mercúrio, reduzindo, desta forma, a contribuição capacitiva por ocasião da amostragem de corrente ao final do tempo de vida da gota (BARD e FAULKNER, 1980).

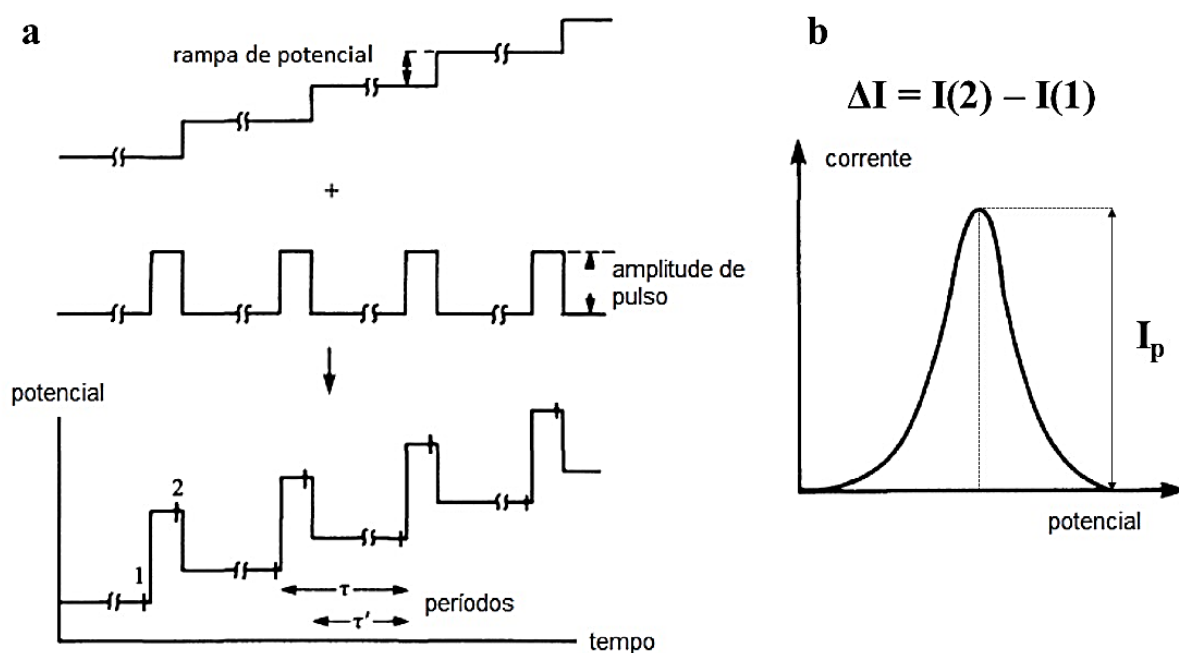
A diferença entre as várias técnicas de pulso é a forma da onda de excitação e a forma de amostragem da corrente (WANG, 2016). Atualmente, as técnicas de pulso mais utilizadas são a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada, que se destacam pela alta sensibilidade quando comparadas às outras técnicas voltamétricas, alcançando limites de detecção comparáveis aos obtidos pelas técnicas cromatográficas na ordem de  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> (PACHECO *et al.*, 2013)

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixa são aplicados sobre uma rampa de potencial. A corrente é medida duas vezes, (1) antes da aplicação do pulso e (2) ao final do pulso (Figura 8a). A corrente resultante da subtração das duas correntes medidas,  $\Delta I = I(2) - I(1)$ , é plotada *versus* o potencial aplicado, resultando em um voltamograma, com

pico em forma de gaussiana (Figura 8b), cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito de acordo com a equação 1 (WANG, 2016):

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left( \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 1}$$

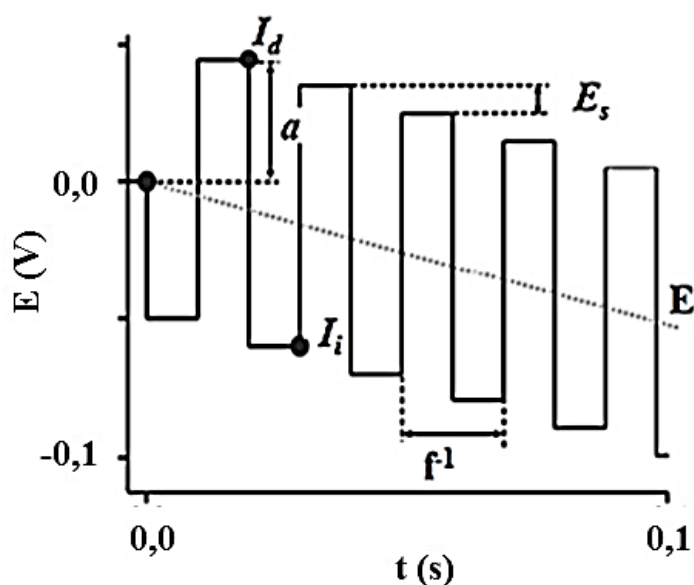
onde  $i_p$  é corrente de pico ( $\mu\text{A}$ ),  $n$  o número de elétrons envolvido na reação redox,  $F$ , a constante de Faraday (C),  $A$ , a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $t_m$  o tempo entre a segunda e a primeira leitura de corrente (s),  $D$ , o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C$  a concentração do analito ( $\text{mmol L}^{-1}$ ),  $\sigma = \exp(nF\Delta E/ 2RT)$  e  $\Delta E$  é a amplitude de pulso.



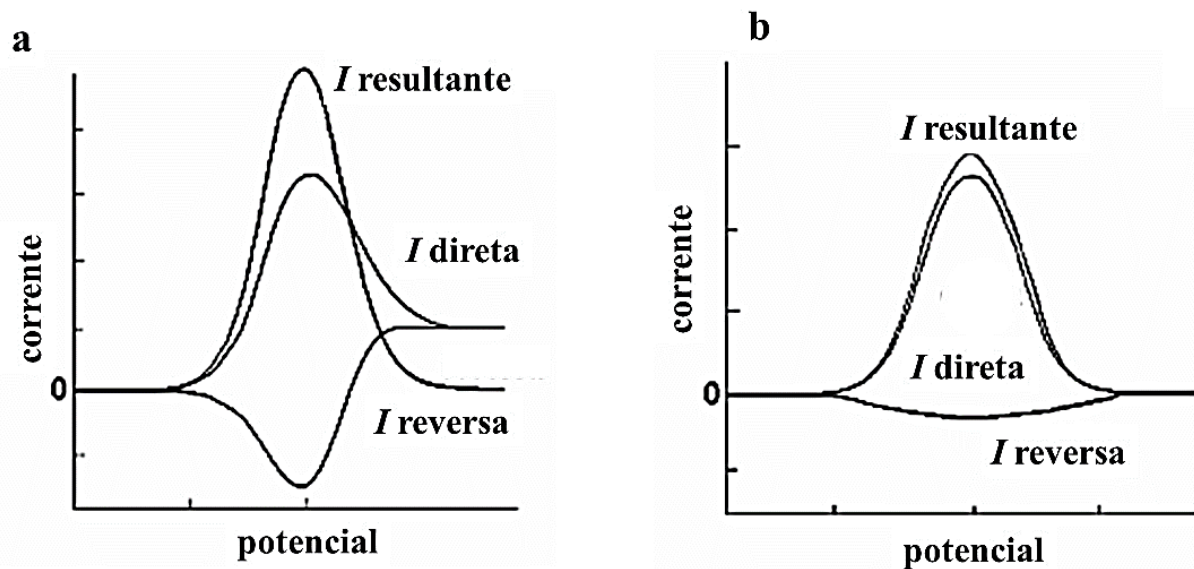
**Figura 8** - (a) Representação do funcionamento da técnica de voltametria de pulso diferencial e (b) voltamograma de pulso diferencial (PACHECO *et al.*, 2013).

A corrente medida dessa forma apresenta uma menor contribuição da corrente de fundo, aumentando a sensibilidade da técnica (BRETT e BRETT, 1996). À medida em que se aplica o pulso, ocorre um aumento da contribuição das correntes capacitiva e faradaica, entretanto, a corrente capacitiva diminui mais rapidamente que a corrente faradaica. Assim a corrente capacitiva tende a zero, maximizando o sinal analítico (PACHECO *et al.*, 2013).

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Além disso, possibilita a avaliação da cinética e mecanismo do processo redox pela análise dos resultados e a aplicação dos critérios de diagnóstico (ZACHOWSKI *et al.*, 1986). Inventada por RAMALEY e KRAUSE em 1969, e desenvolvida por OSTERYOUNG e colaboradores (CHRISTIE *et al.* 1977; OSTERYOUNG e O'DEA, 1982), a voltametria de onda quadrada envolve a aplicação de pulsos de potencial em forma de uma onda quadrada sobrepostos em uma rampa de potencial, como é mostrado na Figura 9. Esta sobreposição é feita de forma que o pulso direto coincida com o início do degrau da rampa e o pulso reverso com a metade do degrau (PACHECO *et al.*, 2013). Na voltametria de onda quadrada, a corrente é medida ao final de cada pulso da onda quadrada, onde a magnitude da corrente capacitiva já está minimizada, no sentido direto e no sentido reverso. A corrente resultante é a subtração das duas correntes medidas,  $\Delta I = I_i - I_d$ , permitindo a discriminação efetiva de processos faradaicos de correntes de carga. O voltamograma de onda quadrada resultante é um pico simétrico semelhante ao voltamograma de pulso diferencial (Figura 10). A Figura 10a apresenta o perfil voltamétrico teórico de um sistema totalmente reversível e a Figura 10b de um sistema totalmente irreversível.



**Figura 9** - Representação esquemática do funcionamento da técnica de voltametria de onda quadrada (DAUPHIN-DUCHARME *et al.*, 2017). a: amplitude de pulso, f: frequência;  $E_s$ : incremento de pulso,  $I_d$ : corrente no sentido direto,  $I_i$ : corrente no sentido inverso.



**Figura 10** - Voltamogramas de onda quadrada. Perfis voltamétricos teóricos para (a) sistema totalmente reversível e (b) sistema totalmente irreversível (SOUZA *et al.*, 2003).

A altura do pico formado na voltametria de onda quadrada é proporcional à concentração do analito da mesma maneira que a altura de pico no voltamograma de pulso diferencial (BARD e FAULKNER, 1980). A grande vantagem da voltametria de onda quadrada em relação a voltametria de pulso diferencial é a velocidade de obtenção dos dados. Na voltametria de onda quadrada é possível utilizar frequências de 1 a 100 Hz, o que proporciona velocidades de varredura mais rápidas, entre 100 a 1000  $\text{mV s}^{-1}$ , enquanto a voltametria de pulso diferencial é realizada utilizando velocidades de 1 a 10  $\text{mV s}^{-1}$  (PACHECO *et al.*, 2013).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método baseado em técnicas voltamétricas de pulso para a determinação do modulador redox *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatomanganês(III) (MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>) em amostras biológicas. Para o alcance do objetivo principal, alguns objetivos específicos podem ser relacionados:

- Avaliar o comportamento eletroquímico da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em eletrodo de carbono vítreo;
- Avaliar o eletrodo de carbono vítreo e eletrodos de pasta de carbono e/ou nanotubos de carbono na determinação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, a fim de escolher o eletrodo mais adequado – aquele que proporcionará um método mais sensível e/ou mais seletivo;
- Avaliar as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e onda quadrada e estabelecer os parâmetros da técnica voltamétrica de pulso que proporcionem maior sensibilidade à determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>;
- Obtenção de biomassa fúngica da levedura *Saccharomices cerevisiae*, para emprego como modelo na aplicação do método em amostras biológicas;
- Validar o método, com consequente obtenção dos parâmetros de desempenho analítico para a determinação da porfirina em soluções aquosas e em amostras de biomassa fúngica.

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e soluções

Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água previamente destilada e purificada por um sistema Milli-Q, à temperatura ambiente. Os reagentes para o preparo das soluções utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho foram sem purificação adicional: cloreto de sódio (p.a., Merck); fosfato de potássio monobásico (p.a., Nuclear); hidróxido de sódio (99,99%, Sigma-Aldrich); glicose (Dinâmica); extrato de levedura (Vetec); extrato de malte (Himedia) e Peptona (Himedia). O gás nitrogênio (Linde) com pureza de 99,9999% foi utilizado para purgar as soluções antes das medidas voltamétricas.

O eletrólito de suporte utilizado em todas as medidas eletroquímicas foi uma solução-tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8 e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O pH da solução tampão fosfato foi ajustado pela adição de uma solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> e aferido em um pHmetro, previamente calibrado, com eletrodo combinado de vidro. O eletrólito e o pH da solução tampão foram estabelecidos de acordo com trabalhos prévios de determinação voltamétrica de E<sub>1/2</sub> da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> (REBOUÇAS *et al.*, 2008 (b), TOVMASYAN *et al.*, 2014).

A MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> foi sintetizada e cedida pelo Grupo de Porfirinas Aplicadas a Problemas Químicos, Medicinais e Tecnológicos, UFPB. A síntese foi realizada conforme descrita na literatura, partindo da *meso*-tetraquis(2-piridil)porfirina (ADLER *et al.*, 1964; HAMBRIGHT *et al.*, 1985; MAIA, 2015), seguida de sua metalação com acetato de Mn(II) (WIJESEKERA e DOLPHIN, 1994; PINTO, 2013) e alquilação com tosilato de metila (PINTO, 2013). A concentração da solução-estoque aquosa da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> foi determinada espectrofotometricamente, a partir de dados de absorvidade molar da literatura, sendo log  $\epsilon_{453\text{nm}} = 5.11$  para a MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em água (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2002). A solução estoque de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> com concentração de 0,8 mmol L<sup>-1</sup> foi utilizada para o preparo das soluções de 0,2, 0,02 e 0,002 mmol L<sup>-1</sup>, por diluições apropriadas.

O meio de cultura utilizado para o crescimento das células da levedura *Saccharomices cerevisiae* foi o YMA líquido. O meio YMA foi preparado com a dissolução de 10 g de glicose, 5 g de peptona, 3 g de extrato de malte e 3 g de extrato de levedura em balão volumétrico de 1,00 L. O meio foi transferido para erlenmeyers de 250 mL, os quais

foram tampados com algodão e gaze recobertos por papel alumínio e, em seguida esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121 °C.

### **3.2 Obtenção e preparo das amostras**

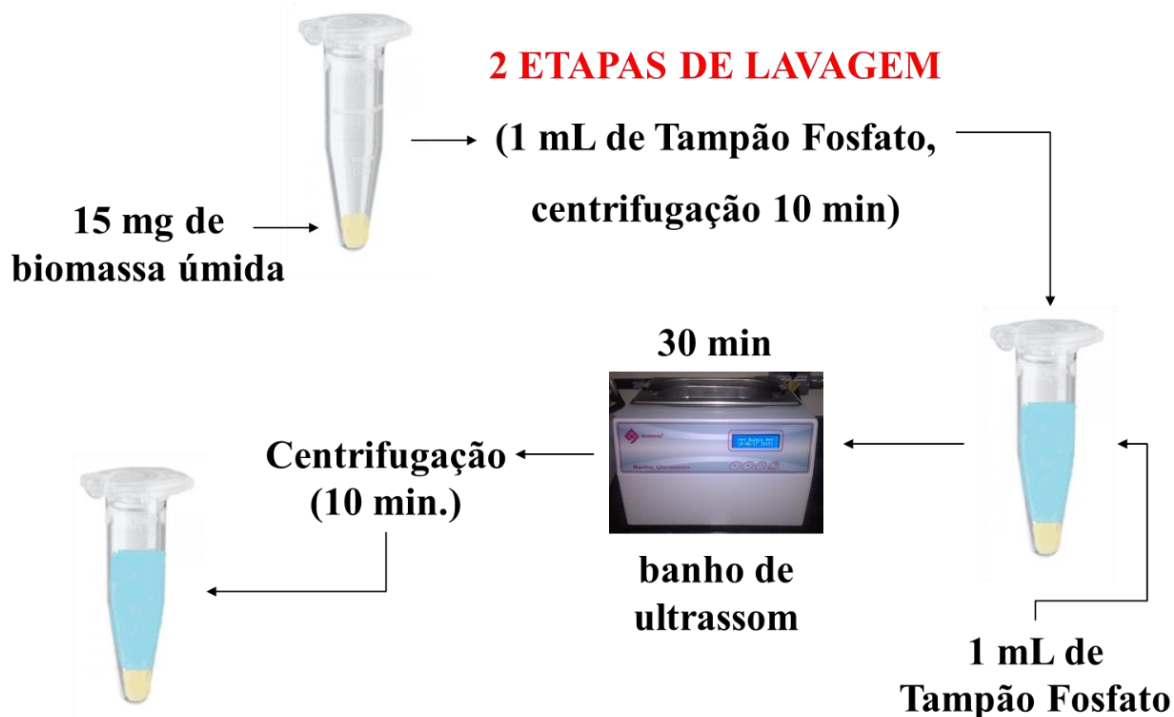
Inicialmente, a ativação das células íntegras da levedura foi realizada, pela suspensão de 1 g de fermento biológico fresco em 10 mL de água morna previamente autoclavada. Essa suspensão foi inoculada em 0,5 mL de meio por 24 hrs. Após as 24 horas, a biomassa resultante foi filtrada e lavada.

Para o crescimento da biomassa total, foram adicionados em erlenmeyers de 1 L, 500 mL do meio YMA líquido (Figura 11). Os erlenmeyers foram vedados com algodão e gaze, recobertos com papel alumínio e esterilizados em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C. Após resfriamento, o meio estéril foi inoculado em câmara de fluxo laminar com uma alíquota de 0,5 mL de suspensão de células (biomassa obtida previamente por 24 h). Em um dos erlenmeyers foi adicionado uma solução aquosa estéril de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> para a obtenção de uma concentração final de 20 µmol L<sup>-1</sup>. Os erlenmeyers foram novamente vedados e, então, incubados a 30°C sob agitação orbital 180 rpm por 72 horas. A biomassa resultante foi centrifugada por 10 min em rotação de 4.000 rpm e lavada (para retirada do excesso do meio de cultura).



**Figura 11** – Erlenmeyers contendo a solução de meio de cultura YMA líquido com  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> (esquerda) e na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> (direita).

As amostras de biomassa foram preparadas de acordo com o esquema apresentado na Figura 12. Em tubos do tipo eppendorf (1,5 mL), 15 mg de biomassa úmida foram pesados, lavados com 1 mL de tampão fosfato à 4°C, e centrifugados a 4000 rpm por 10 min. Após duas etapas de lavagem, a biomassa foi ressuspensa em 1 mL de tampão fosfato e colocada em banho ultrassônico de 40 KHz de frequência por 30 min. Após o tempo de sonicação, as amostras foram novamente centrifugadas e, os extratos (sobrenadantes) obtidos foram devidamente armazenados sob refrigeração abaixo de 0° C até o momento da análise. Para os testes de recuperação concentrações conhecidas de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> foram adicionadas aos extratos obtidos das amostras de biomassa crescida sem MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.



**Figura 12-** Esquema das etapas de preparo da amostra de biomassa fúngica.

### 3.3 Célula eletroquímica e eletrodos

A célula eletroquímica utilizada nos testes voltamétricos era composta por três eletrodos, um eletrodo de referência, Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), um eletrodo auxiliar, fio de platina, e um eletrodo de trabalho. Foram avaliados como eletrodos de trabalho os eletrodos de carbono vítreo (ECV), eletrodo de pasta de carbono (EPC), eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (ENTC) e eletrodo de pasta de carbono com nanotubos de carbono (EPCNTC).

Os eletrodos de pasta foram confeccionados misturando os sólidos com óleo mineral nas proporções apresentadas na Tabela 1. Foram empregados nanotubos de carbono (9,5 nm diâmetro médio  $\times$  1,5  $\mu\text{m}$  comprimento dos nanotubos) de múltiplas paredes. Os nanotubos e o grafite utilizados para a confecção dos eletrodos foram obtidos da Sigma-Aldrich. As misturas foram maceradas em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo de porcelana por aproximadamente 40 minutos, até obtenção de uma pasta homogênea. Em seguida, a pasta foi compactada na ponta de uma seringa plástica de 3mL, bico *luer slip*, utilizando um fio de cobre, com diâmetro de 3 mm, como êmbolo e contato elétrico. Para limpeza e renovação da superfície os eletrodos foram apenas riscados em uma folha de papel sulfite limpa, usando-se

o fio de cobre para extrusão da nova camada de pasta. A renovação da superfície foi realizada antes de cada experimento. É importante ressaltar que, uma vez que a porfirina era adsorvida fortemente à pasta, era necessário riscar repetidas vezes a superfície do eletrodo na folha de papel sulfite.

**Tabela 1** - Composição dos eletrodos de trabalho em % m<sup>-1</sup>.

<b>Eletrodos</b>	<b>Pó de grafite (%)</b>	<b>Nanotubos (%)</b>	<b>Óleo mineral (%)</b>
EPC	70	-	30
ENTC	-	70	30
EPCNTC	50	20	30

O eletrodo de carbono vítreo foi polido, antes de cada medida, em suspensão de alumina 0,05 µm, com auxílio de uma Lixadeira/Politriz Universal Arotec AROPOL-2V por aproximadamente dois minutos, sendo, em seguida, colocado em banho ultrassônico por 5 minutos em acetonitrila.

Para eliminação de possíveis contaminações da célula eletroquímica com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> proveniente de experimentos anteriores, a célula eletroquímica era cuidadosamente lavada, enxaguada com água purificada, e mergulhada em uma solução de ácido sulfúrico 20% v/v. Após alguns minutos, a célula era novamente enxaguada abundantemente com água purificada.

### 3.4 Procedimento experimental

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 101 acoplado ao módulo polarográfico 663 VA Stand® (Metrohm, Suíça) e a um microcomputador com o *software* NOVA 1.11.

Antes de cada medida voltamétrica, a solução foi purgada com N<sub>2</sub>(g) durante 5 minutos. Voltamogramas cíclicos foram obtidos com o ECV em 3 mL de eletrólito-suporte na presença de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, inicialmente, em uma janela de potencial de -0,25 a 0,25 V vs. Ag/AgCl, obtendo três ciclos

voltamétricos, e em seguida em uma janela de potencial de  $-1,5$  a  $1,0$  V vs. Ag/AgCl. Na janela de potencial de  $-0,25$  a  $0,25$  V vs. Ag/AgCl, observa-se a atividade redox do par  $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ , centrado no anel porfirínico. Na sequência do trabalho, todas as medidas voltamétricas foram realizadas utilizando a janela de potencial de  $-0,25$  a  $0,25$  V vs. Ag/AgCl. O estudo da velocidade de varredura foi realizado, através da obtenção de voltamogramas cíclicos com ECV em 3 mL de eletrólito-suporte na presença de  $0,1$  mmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> com velocidade de varredura variando de 5 a 200 mV s<sup>-1</sup>.

Os estudos com as técnicas de pulso, para escolha da técnica mais sensível ao analito, foram realizados em 3 mL de eletrólito-suporte na presença de  $1$  μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, utilizando o ECV. A avaliação dos eletrodos de trabalho foi realizada em 3 mL de eletrólito-suporte na presença de  $1$  μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, obtendo voltamogramas com o EPC, ENTC, EPCNTC, empregando a técnica voltamétrica de pulso mais sensível à MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> quando utilizado o ECV.

O estudo dos parâmetros da técnica de pulso escolhida foi realizado com o eletrodo de trabalho que apresentou maior sensibilidade e/ou seletividade em 10 mL de eletrólito-suporte na presença de  $0,1$  μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. A otimização dos parâmetros foi realizada de forma univariada. O primeiro parâmetro avaliado foi o incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ), fixando-se os valores de frequência e amplitude, e variando o  $\Delta E_s$  de  $0,5$  a  $20$  mV. Seguido da avaliação da frequência, fixando-se o  $\Delta E_s$  e a amplitude, variando a frequência de  $10$  a  $100$  Hz. O último parâmetro avaliado foi a amplitude, variando de  $10$  a  $100$  mV e fixando os  $\Delta E_s$  e a frequência.

Nas medidas de voltametria de onda quadrada e pulso diferencial a correção de linha de base foi executada pelo uso da técnica da média móvel e, quando necessária, foi realizada a suavização dos voltamogramas usando a técnica de Savitzky–Golay. Os gráficos foram produzidos utilizando o software OriginPro 8.0.

Para a construção da curva analítica, a técnica voltamétrica de pulso mais sensível foi empregada utilizando os parâmetros otimizados. Os voltamogramas foram obtidos em 10 mL de eletrólito-suporte com sucessivas adições de  $100$  μL de soluções estoque de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, com concentrações de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> variando de  $0,02$  μmol L<sup>-1</sup> a  $10,10$  μmol L<sup>-1</sup>. Não foi necessária a renovação da superfície do eletrodo a cada adição. Antes da primeira adição foram obtidos quinze voltamogramas do eletrólito-suporte (brancos analíticos). As curvas analíticas foram construídas observando-se a região onde houvesse uma relação linear

entre a concentração e a corrente observada. Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram empregadas as equações abaixo:

$$LD = \frac{3 s}{b} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{10 s}{b} \quad \text{Equação 3}$$

onde  $s$ , é o desvio-padrão das correntes do branco; e  $b$  a sensibilidade do método, que foi definido como equivalente ao coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, 2005).

As curvas analíticas obtidas foram avaliadas pelo método de análise de variância (ANOVA). Foi considerado que os erros seguem uma distribuição normal. Assim, a significância da regressão foi estimada pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática do resíduo, que foi comparada ao valor de F tabelado, em um intervalo de confiança de 95%. Quando a razão das médias quadráticas é maior que o valor de F tabelado e os resíduos mostram-se aleatórios, fica evidenciada a relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  (BRUNS *et al.*, 2006). A Tabela 2 apresenta as equações utilizadas na ANOVA. Nessa tabela,  $p$  significa o número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração proposto;  $n$ , o número total de medidas;  $m$ , o número de níveis distintos da variável; e  $i$  indica o nível da variável  $x$  e  $j$  correspondente as medidas repetidas da variável  $y$  em um nível de  $x$ .

**Tabela 2** - Equações da ANOVA para um modelo de regressão (MONTGOMERY, 2013)

ANOVA	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$\sum n_i [y_{e_i} - y_m]^2$	$p - 1$	$SQ_{reg} / (p - 1)$
Resíduo	$\sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$SQ_{re} / (n - p)$
Falta de Ajuste	$\sum n_i [y_{e_i} - y_{im}]^2$	$m - p$	$SQ_{faj} / (m - p)$
Erro puro	$\sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$SQ_{ep} / (n - m)$

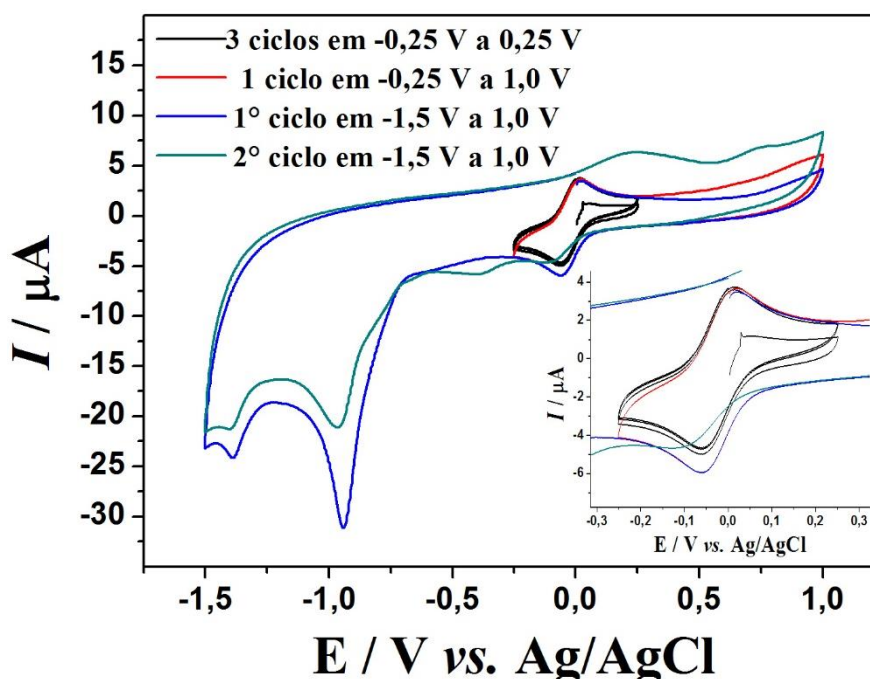
Para as análises das amostras de biomassa fúngica crescidas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, foi utilizado 1 mL do extrato previamente preparado (item 3.2), e solução eletrólito-suporte totalizando um volume de 3 mL na célula eletroquímica. As adições de padrão foram realizadas de maneira que compreendessem a faixa linear de resposta obtida na curva analítica em solução aquosa. As concentrações da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> nas amostras foram calculadas a partir da extrapolação da reta obtida pelo gráfico da corrente em função da concentração de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Como validação do método também foram realizados testes de recuperação aparente baseados na fortificação de amostras de biomassa fúngica com concentrações conhecidas de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. Para os testes de recuperação aparente foi empregada a mesma metodologia experimental utilizada para a análise das amostras de biomassa fúngica crescidas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

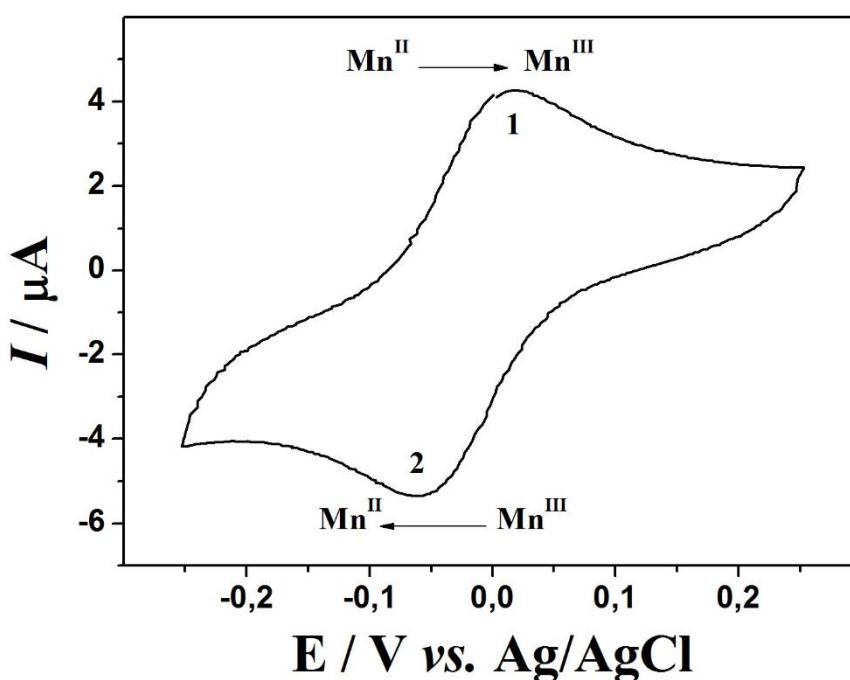
### 4.1 Comportamento eletroquímico da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>

Sabe-se que as metaloporfirinas são complexos muito eletroativos, podendo ocorrer processos redox no centro metálico, nos ligantes e até processos envolvendo transferência de prótons (GROVER *et al*, 2016; BATINIC-HABERLE *et al.*, 1999; KADISH *et al*, 2007). A fim de se conhecer o comportamento voltamétrico da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> no eletrólito-suporte, os voltamogramas cíclicos foram obtidos inicialmente em uma janela de potencial de -0,25 V a 0,25 V vs. Ag/AgCl. Após três ciclos nessa janela de potencial, a varredura direta foi executada até o potencial de 1,0 V, retornando ao potencial de -0,25 V, completando o quarto ciclo. Logo em seguida, mais dois ciclos foram obtidos, porém com o potencial de inversão de -1,5 V (Figura 13). Nos primeiros voltamogramas, de -0,25 V a 0,25 V vs. Ag/AgCl, observam-se dois picos, um anódico e outro catódico, próximos a 0 V. Quando a varredura direta é estendida até 1,0 V, não se observa nenhum pico adicional. Por outro lado, quando a varredura reversa de potenciais se estende a potenciais tão negativos quanto -1,5 V, observa-se o aparecimento de mais dois picos catódicos em aproximadamente -1,0 V e -1,4 V. No segundo ciclo, são observados dois picos anódicos próximos a 0,2 V e 0,7 V, respectivamente, e 5 picos catódicos na região de -0,1 V a -1,4 V.



**Figura 13** - Voltamogramas cíclicos em solução de  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>;  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>.

Nos voltamogramas obtidos na janela de potencial de -0,25 V a 0,25 V *vs.* Ag/AgCl observa-se processos de oxidação e redução bem definidos. Para melhor visualização, a Figura 14 apresenta o voltamograma nessa janela de potencial separadamente. O processo redox do centro metálico ( $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ ) da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> já foi reportado na literatura (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010) e apresenta um  $E_{1/2}$  de 222 mV *vs.* NHE. Os processos de oxidação e redução observados estão em consonância com a literatura (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010), com um pico anódico em 0,013 V e um pico catódico em -0,058 V. Dessa forma, o  $E_{1/2}$  estimado é de -22 mV *vs.* Ag/AgCl, ou seja, é de 183 mV *vs.* NHE.



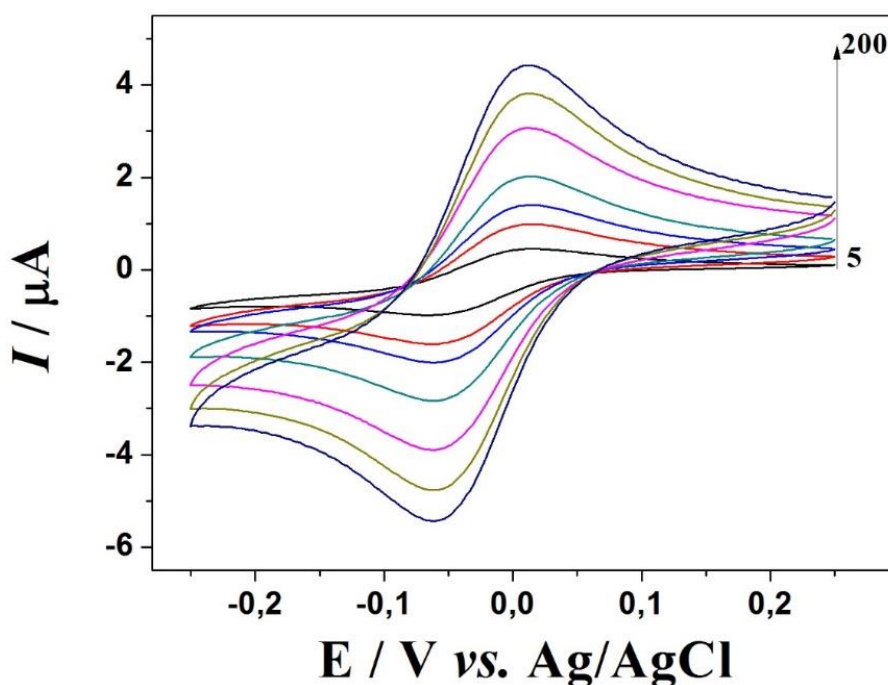
**Figura 14** - Voltamograma cíclico em solução de  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> com ECV em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>;  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>. (1) pico anódico e (2) pico catódico.

Com base no que é reportado na literatura para análise voltamétrica de outras porfirinas substituídas (BARROS, 2003) os picos catódicos que aparecem nos voltamogramas com a janela de potencial de -1,5 a 1,0 V Ag/AgCl podem ser atribuídos aos processos de redução dos substituintes 2-metil-piridil. O pico em -1,0 V diminui de intensidade no segundo ciclo realizado na janela de potencial de -1,5 a 1,0 V Ag/AgCl, podendo ser atribuído à redução do anel porfirínico em um processo irreversível. É observado também que o pico de

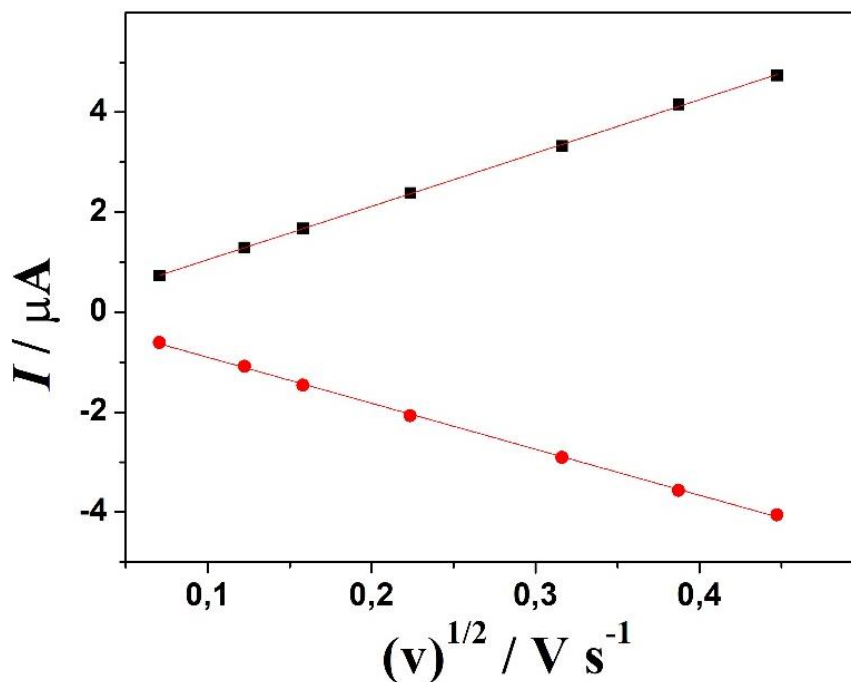
oxidação e redução do centro metálico no segundo ciclo em janela de potencial de -1,5 a 1,0 V Ag/AgCl, deslocam-se para potenciais mais distantes de 0 V. Evidenciando que o processo redox do par  $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$  é influenciado pelos processos que ocorrem no anel porfirínico.

Esta caracterização prévia da  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  foi realizada com o intuito de destacar a atividade eletroativa da mesma. Porém uma caracterização mais detalhada não foi realizada devido à complexidade da molécula e necessidade de análises complementares (por exemplo, espectroeletróquímica e RPE à baixa temperatura) (WEITNER *et al.*, 2013; WEITNER *et al.*, 2010).

Para obter mais informações sobre a reversibilidade do processo redox  $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$  o estudo da influência da velocidade de varredura foi realizado na janela de potencial de -0,25 a 0,25 V vs. Ag/AgCl. A Figura 15 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes velocidades de varredura e a Figura 16, o gráfico da relação entre as correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



**Figura 15** - Voltamogramas cíclicos em solução de  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  com ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; velocidade de varredura variando de 5 a  $200 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 16** - Variação das correntes de pico anódica (quadrados) e catódica (círculos) *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Na Figura 16, é possível observar a variação linear entre as correntes de pico anódico e catódico com o aumento da velocidade de varredura. As equações 4 e 5, foram obtidas para o pico catódico e para o pico anódico, respectivamente:

$$I_{pc} (\mu A) = 1,768 \times 10^{-8} - 9,201 \times 10^{-6} (mV^{1/2} s^{-1/2}) \quad R^2 = 0,999 \quad \text{Equação 4}$$

$$I_{pa} (\mu A) = -1,698 \times 10^{-8} + 1,067 \times 10^{-5} (mV^{1/2} s^{-1/2}) \quad R^2 = 0,999 \quad \text{Equação 5}$$

Analisando a Figura 15, observa-se que os potenciais dos picos anódicos e catódicos permanecem constantes com o aumento da velocidade de varredura, sendo o  $\Delta E_p(\text{médio}) = 0,072 V$  e a  $I_{pa}/I_{pc}(\text{média}) = 1,17 \pm 0,02$  ( $n=7$ ). Assim, como há linearidade das correntes de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, os potenciais de pico permanecem quase constantes, e a razão das correntes de pico são próximas a 1. Logo, o processo do par  $Mn^{III}/Mn^{II}$  é um sistema totalmente reversível (BARD & FAULKNER, 1980).

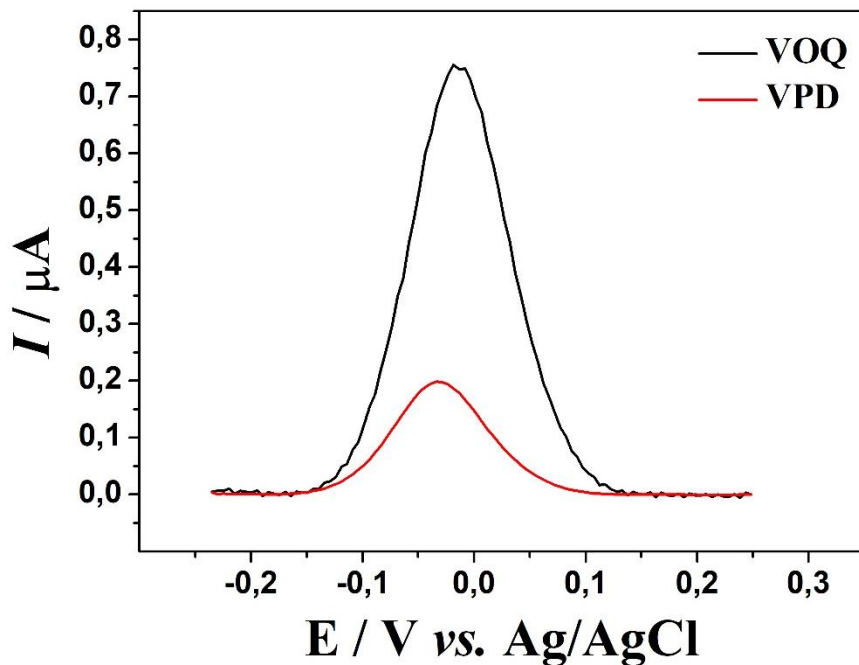
Para o desenvolvimento da técnica analítica, optou-se por utilizar somente a janela de potencial em que ocorre o processo redox do centro metálico ( $-0,25$  V a  $0,25$  V), uma vez que o mesmo apresenta reversibilidade e potenciais de oxidação e redução próximos a  $0$  V vs. Ag/AgCl, reduzindo a chance de oxidação e redução de possíveis interferentes da matriz quando na análise de sistemas de origem biológica.

## 4.2 Desenvolvimento da metodologia de quantificação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>

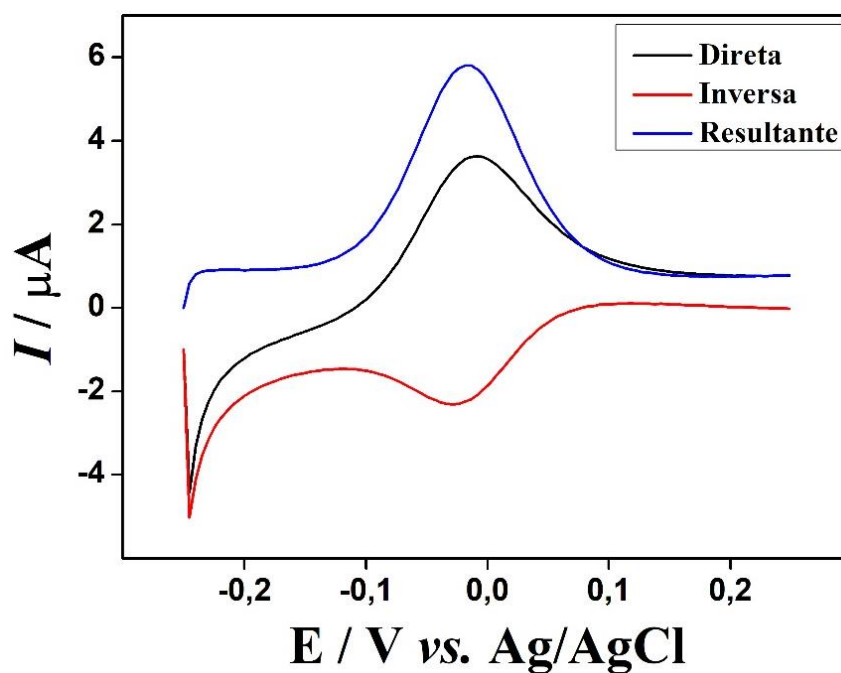
### 4.2.1. Avaliação das técnicas voltamétricas de pulso

Para o desenvolvimento do método de determinação, duas técnicas voltamétricas de pulso foram avaliadas: a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial. A Figura 17 apresenta os voltamogramas obtidos com ambas as técnicas e eletrodo de carbono vítreo. Na voltametria de onda quadrada, os parâmetros empregados foram:  $\Delta E_i = 5$  mV,  $a = 20$  mV,  $f = 25$  Hz,  $\nu = 125$  mV s<sup>-1</sup>. Para a voltametria de pulso diferencial, os parâmetros empregados foram:  $\Delta E_i = 5$  mV,  $a = 25$  mV,  $T_p = 0,05$  s,  $\nu = 20$  mV s<sup>-1</sup>. Com estas condições experimentais, a voltametria de onda quadrada mostrou-se mais sensível para a determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, apresentando uma corrente de pico 4 vezes maior que na voltametria de pulso diferencial, sendo, portanto, a escolhida para o desenvolvimento do método.

Este é um resultado esperado, uma vez que a técnica de voltametria de onda quadrada é mais sensível para sistemas reversíveis, pois a corrente resultante é a subtração da corrente direta da corrente inversa (SOUZA *et al.*, 2003). Além disso, maiores correntes também são alcançadas na voltametria de onda quadrada dadas as maiores velocidades de varredura alcançadas. A Figura 18 apresenta a decomposição do voltamograma de onda quadrada nas suas respectivas componentes direta, inversa e resultante separadas, confirmando a reversibilidade do processo redox.



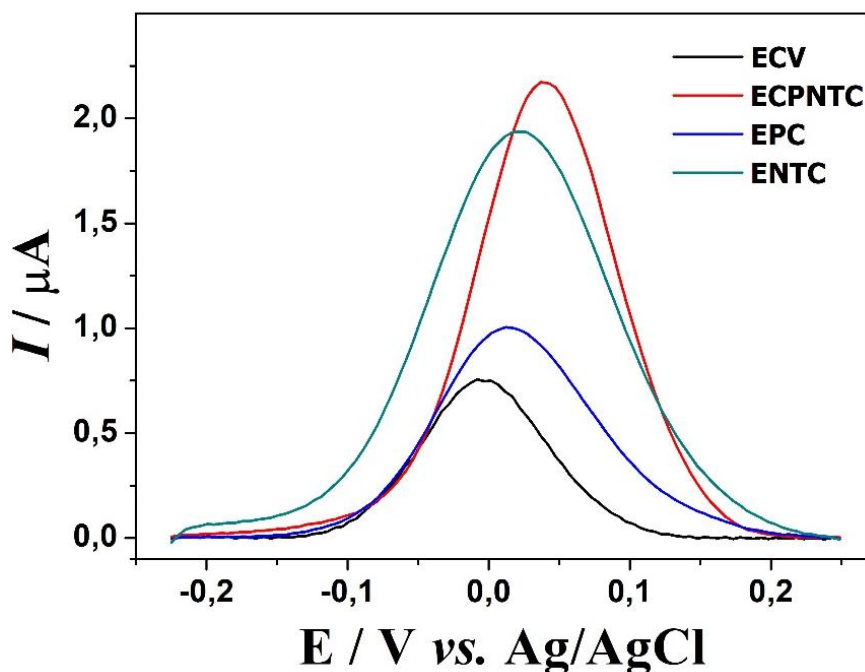
**Figura 17** - Voltamogramas de onda quadrada e pulso diferencial obtidos em solução de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  com ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 18** - Componentes do voltamograma de onda quadrada obtido em solução de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  com ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$  e  $f = 25 \text{ s}^{-1}$ .

#### 4.2.2. Avaliação dos eletrodos de trabalho

Além da técnica voltamétrica, foram avaliados diferentes tipos de eletrodos à base de carbono como eletrodos de trabalho. A Figura 19 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos com os quatro eletrodos avaliados.



**Figura 19** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> com diferentes eletrodos de trabalho, em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>;  $\Delta E_s = 5$  mV,  $a = 20$  mV e  $f = 25$  s<sup>-1</sup>.

Observando-se os voltamogramas, é possível perceber que os eletrodos contendo nanotubos de carbono apresentaram uma corrente de pico com maior intensidade, provavelmente relacionada à maior área eletroativa característica dos nanotubos e também pelo fato que o transporte de elétrons é favorecido na presença dos nanotubos de carbono (SUNDARI *et al.*, 2010). Entre os quatro eletrodos avaliados, o ECPNTC foi o que apresentou maior sensibilidade para a determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, uma vez que a corrente de pico foi maior que as outras obtidas com os outros eletrodos. Esse resultado é corroborado pela tendência de Mn-porfirinas catiônicas derivadas das *N*-alquiperidilporfirinas

de interagirem com nanotubos de carbono, conforme estudos independentes anteriores (SÁFAR *et al.*, 2014, 2012).

Nos voltamogramas da Figura 19, é possível observar também, que há um pequeno deslocamento de potencial dos picos obtidos para os diferentes eletrodos. O ECV apresentou o pico mais próximo a 0 V e os eletrodos de pasta tiveram o potencial de pico deslocado para valores mais positivos, sendo o EPCNTC o que apresentou potencial de pico mais positivo. Essa diferença de potencial evidencia que para o EPCNTC a transferência eletrônica é realizada em condições mais desfavoráveis, requerendo mais energia para a oxidação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, enquanto a transferência eletrônica é favorecida quando a oxidação é realizada sobre o ECV. Com potencial de pico mais próximo a 0 V, a determinação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> baseada no par redox Mn<sup>III</sup>/Mn<sup>II</sup> é mais seletiva com o emprego do ECV em comparação aos outros eletrodos, que apresentaram potenciais mais distantes de 0 V.

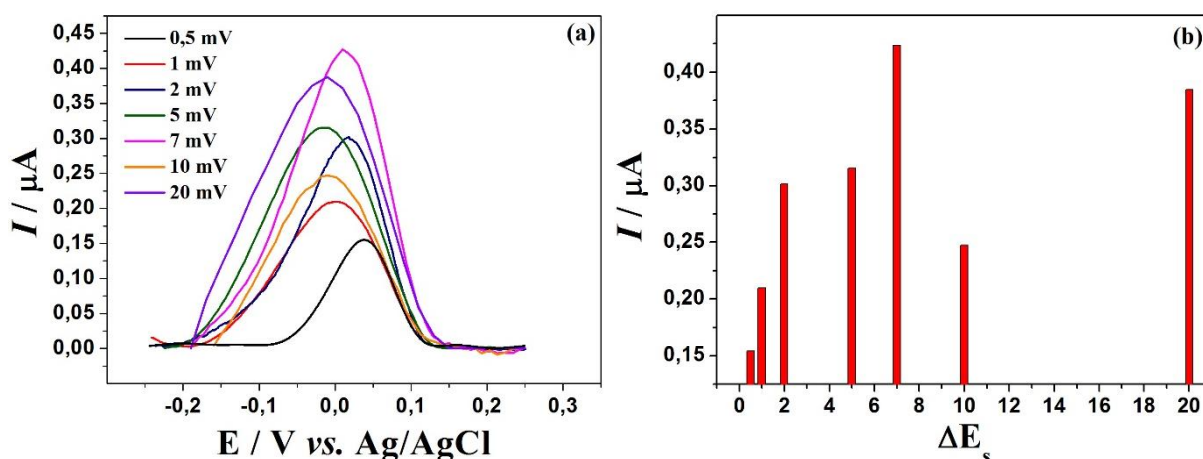
Assim, para dar continuidade ao desenvolvimento do método, foram utilizados dois eletrodos de trabalho, o EPCNTC, por apresentar maior sensibilidade, e o ECV, por apresentar maior seletividade. Além disso, o ECV trata-se de um eletrodo comercial, de fácil aquisição e amplamente empregado como eletrodo de trabalho nos estudos empregando MnP como moduladores redox (REBOUÇAS *et al.*, 2008 (b), TOVMASYAN *et al.*, 2014).

#### **4.2.3. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada**

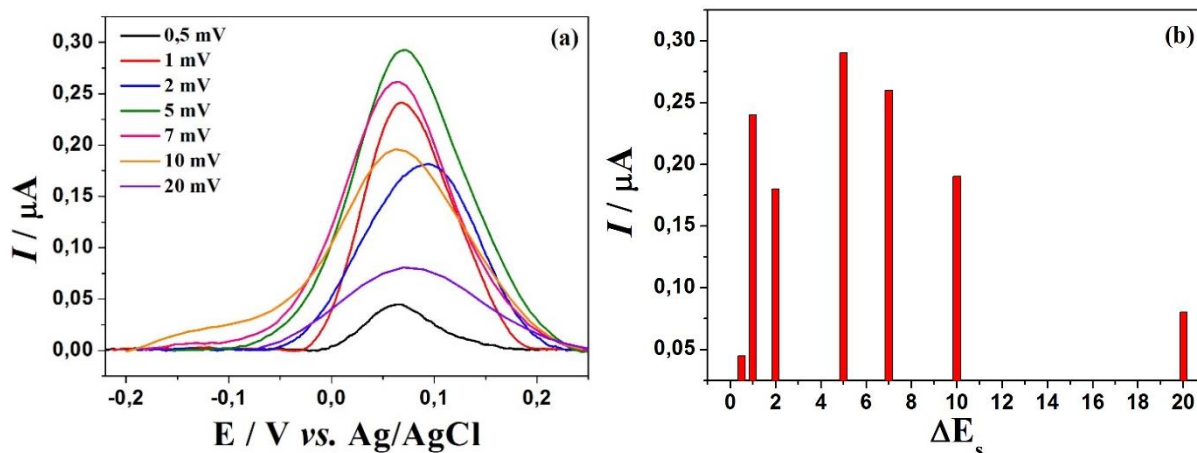
Para o desenvolvimento de um método sensível, é de extrema importância a avaliação dos parâmetros da técnica voltamétrica, uma vez que estes influenciam diretamente na corrente medida e, conseqüentemente, na sensibilidade. O estudo dos parâmetros da técnica de onda quadrada foi realizado de forma univariada, avaliando-se a influência do incremento de potencial,  $\Delta E_s$ , da frequência,  $f$ , e da amplitude de pulso,  $a$ , sobre o potencial e a corrente de pico.

O incremento de potencial foi o primeiro parâmetro avaliado, pois ele está diretamente relacionado com a velocidade de varredura, uma vez que esta é o produto do incremento de potencial e da frequência (SOUZA *et al.*, 2003). Para a avaliação do incremento de potencial fixou-se os valores da frequência em 25 Hz e amplitude em 20 mV, e obteve-se voltamogramas de onda quadrada com incremento de potencial variando entre 0,5 mV e 20 mV. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para a avaliação do incremento de

potencial para o ECV. Na Figura 20a estão apresentados os voltamogramas e na Figura 20b, as correntes de pico obtidas em cada incremento de potencial estudado. É possível observar na Figura 20b que não há uma relação direta entre o aumento do incremento de potencial e o aumento da intensidade do pico. Na Figura 20a, é observado também o deslocamento do potencial de pico para alguns valores de incremento de potencial. Escolheu-se o incremento de potencial de 7 mV para o ECV, uma vez que com esse valor o voltamograma apresentou um pico com maior intensidade de corrente e com potencial de pico mais próximo de 0 V. Um comportamento similar foi observado na avaliação do incremento de potencial para o EPCNTC (Figura 21). Entretanto, o valor de incremento de potencial que apresentou maior intensidade de corrente de pico corresponde a 5 mV.

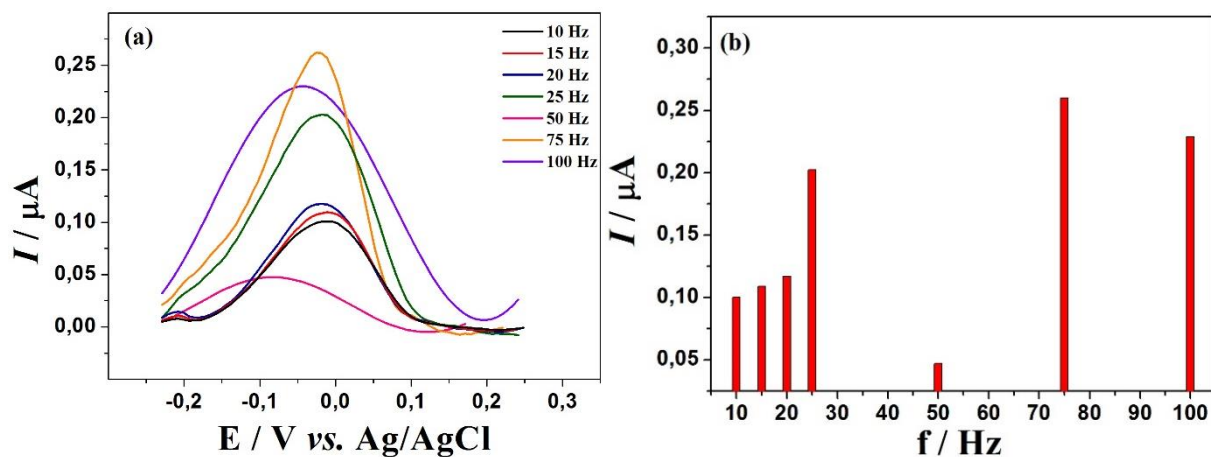


**Figura 20** - Estudo da variação do incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ); (a) voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  com ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 20 \text{ mV}$ ;  $f = 25 \text{ Hz}$ ; (b) relação entre as  $I_p$  e os  $\Delta E_s$ .

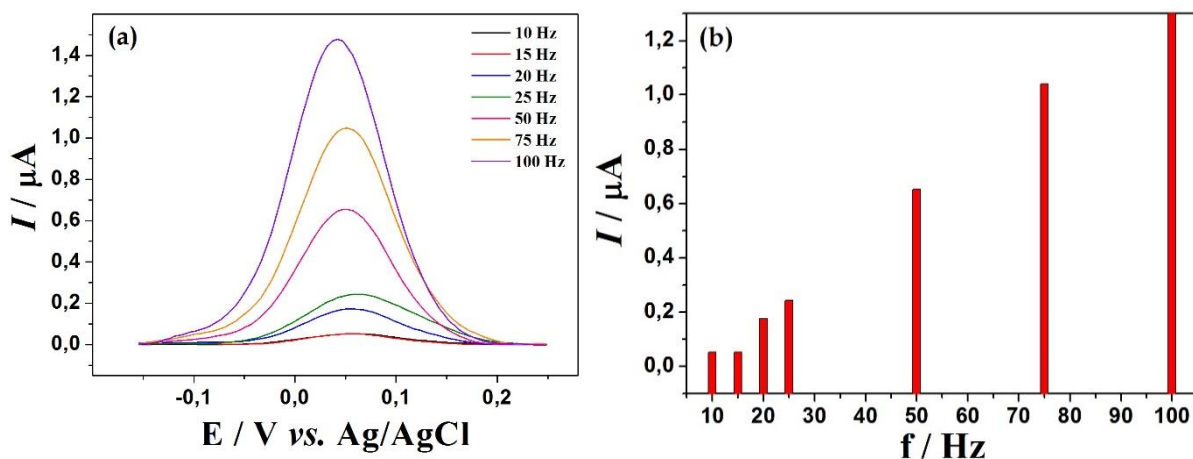


**Figura 21** - Estudo da variação do incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ); (a) voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  com EPCNTC em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 20 \text{ mV}$ ;  $f = 25 \text{ Hz}$ ; (b) relação entre as  $I_p$  e os  $\Delta E_s$ .

Para avaliar a frequência, fixou-se o valor estabelecido de incremento de potencial, 7 mV e 5 mV para os eletrodos ECV e EPCNTC, respectivamente, com amplitude mantida em 20 mV, e variando-se a frequência entre 10 Hz e 100 Hz. As Figura 22a e 23a apresentam os voltamogramas obtidos com as diferentes frequências para o ECV e o EPCNTC, respectivamente. Para o ECV, observa-se que os valores da corrente de pico aumentam com o aumento da frequência, até 25 Hz. Com o uso de 50 Hz, observa-se uma diminuição do pico, aumentando novamente com a aplicação de 75 Hz, onde observou-se a maior corrente de pico. Para o EPCNTC, observa-se que os valores da corrente de pico aumentaram com o aumento da frequência até 100 Hz. Apesar de o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial causar um aumento na resposta de corrente, com a consequente aumento na sensibilidade da análise, este aumento na frequência deve ser observado com atenção, já que a reversibilidade da reação pode diminuir (SOUZA *et al.*, 2003). Assim, optou-se por não usar a frequência de 100 Hz para o EPCNTC. Portanto, para o prosseguimento do trabalho, foram estabelecidas as frequências de 75 Hz para os eletrodos ECV e EPCNTC.

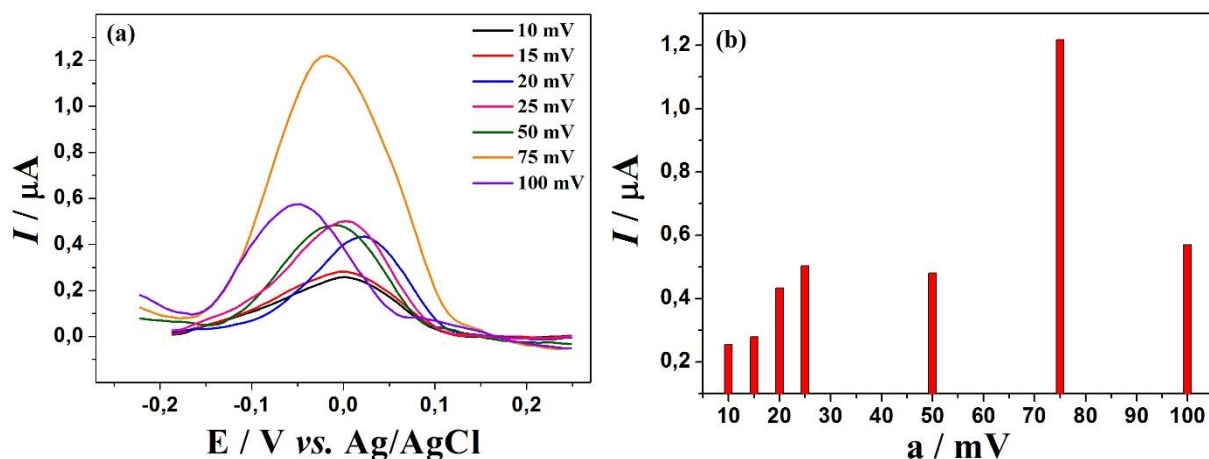


**Figura 22** - Estudo da variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando (a) ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 20 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$  e (b) relação entre as  $I_p$  e as frequências.

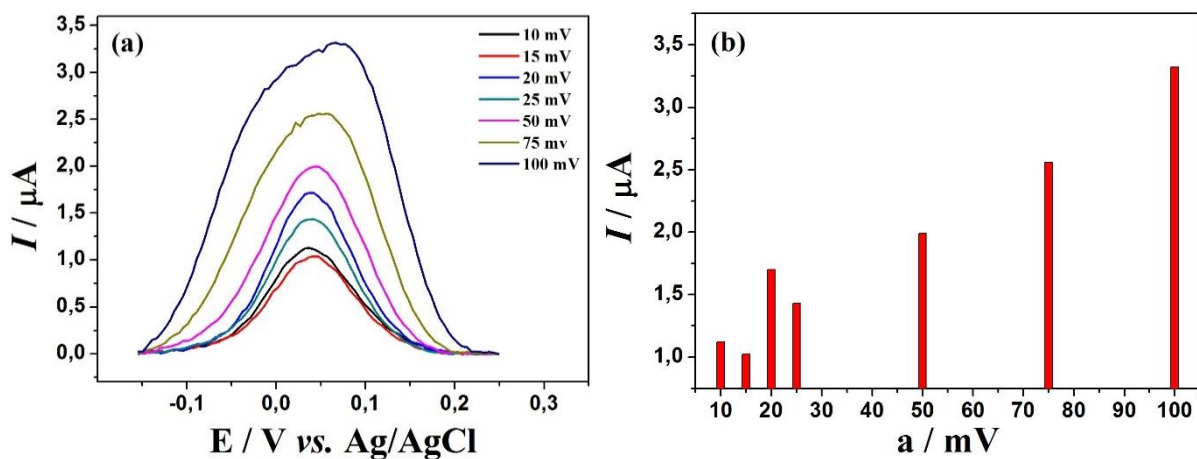


**Figura 23** - Estudo da variação da frequência. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando (a) EPCNTC em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 20 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$  e (b) relação entre as  $I_p$  e as frequências.

O último parâmetro avaliado foi a amplitude de pulso, fixando-se os valores otimizados de incremento de potencial e frequência e variando a amplitude entre 10 mV e 100 mV. As Figura 24a e 25a apresentam os voltamogramas obtidos com diferentes amplitudes para o ECV e o EPCNTC, respectivamente.



**Figura 24** - Estudo da variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando (a) ECV em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$ ,  $f = 20 \text{ Hz}$  e (b) relação entre as  $I_p$  e as amplitudes.



**Figura 25** - Estudo da variação da amplitude. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando (a) EPCNTC em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e  $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ Hz}$  e (b) relação entre as  $I_p$  e as amplitudes.

Na Figura 24a, observa-se que o aumento da amplitude de pulso até  $75 \text{ mV}$  intensifica o sinal analítico. Portanto, a amplitude de  $75 \text{ mV}$  foi escolhida para o ECV, já que apresentou um pico bem definido e com maior intensidade de corrente de pico. Na Figura 24, observa-se que a corrente de pico aumenta com o aumento da amplitude, porém os picos se

tornam assimétricos para amplitudes de pulso maiores que 50 mV, resultantes da maior separação entre as componentes direta e reversa no voltamograma, e também são levemente deslocados para potenciais mais positivos. Assim, 50 mV foi o valor de amplitude escolhido para o EPCNTC. A Tabela 3 reúne os valores dos parâmetros da voltametria de onda quadrada estabelecidos para cada um dos eletrodos investigados.

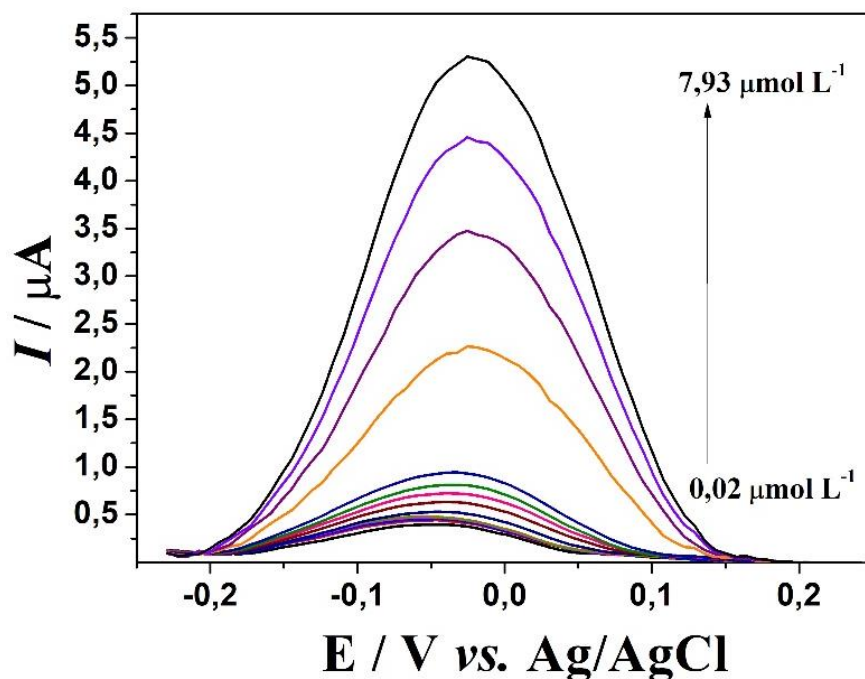
**Tabela 3** - Parâmetros otimizados da técnica de voltametria de onda quadrada.

<b>Parâmetro</b>	<b>ECV</b>	<b>EPCNTC</b>
Incremento de potencial (mV)	7	5
Frequência (Hz)	75	75
Amplitude (mV)	75	50

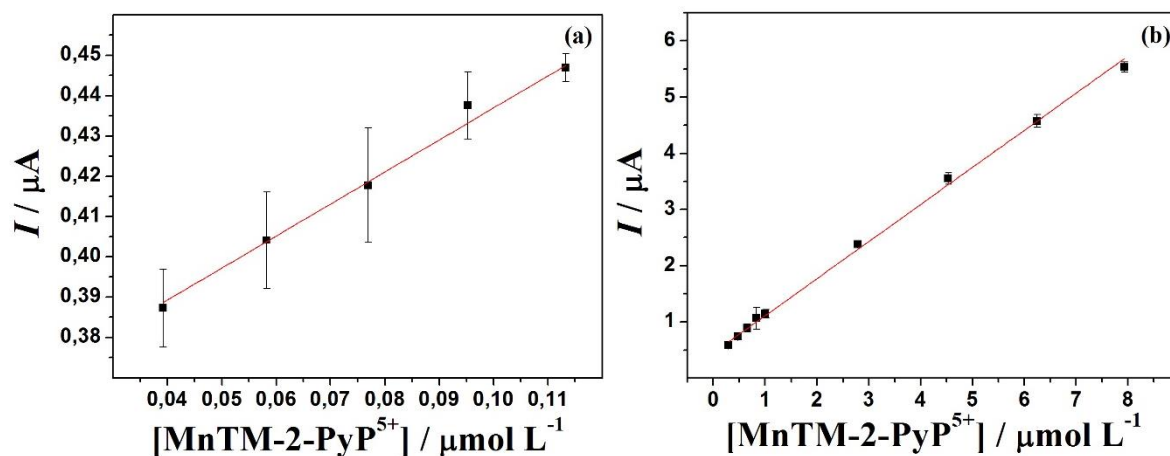
#### **4.2.4. Curvas analíticas**

Com os parâmetros da voltametria de onda quadrada estabelecidos, as curvas analíticas foram obtidas em eletrólito-suporte. Os voltamogramas obtidos utilizando o ECV em diferentes concentrações de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> estão apresentados na Figura 26.

Foi observado que a corrente de pico aumenta com o aumento da concentração de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em duas regiões lineares com sensibilidades distintas, nas faixas de concentração de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 7,93  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As Figura 27a e 27b apresentam as curvas relativas a cada faixa linear de concentração.



**Figura 26** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para sucessivas adições de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> utilizando ECV em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com  $\Delta E_s = 7$  mV,  $f = 20$  Hz e  $a = 75$  mV.



**Figura 27** - Curvas analíticas obtidas através das correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada na faixa linear de (a) 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (b) 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 7,93  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , utilizando ECV, em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>;  $\Delta E_i = 7$  mV,  $f = 75$  Hz e  $a = 75$  mV.

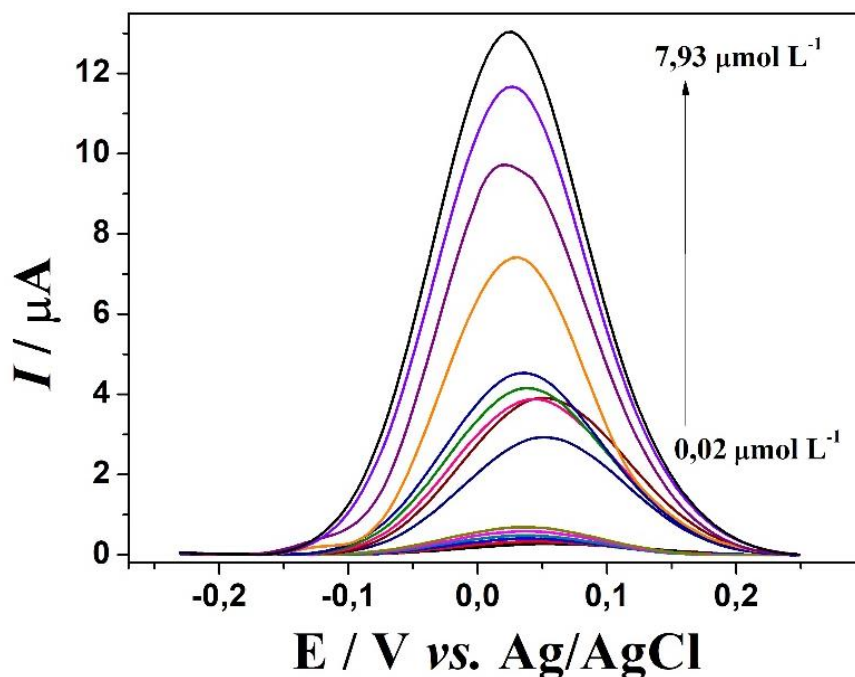
Na Tabela 4, estão resumidos os dados de regressão das equações das curvas analíticas obtidas nas duas faixas lineares de concentração. Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação, foi utilizado a equação da reta da faixa linear de menores concentrações, obtendo limite de detecção de  $19 \text{ nmol L}^{-1}$  e limite de quantificação de  $64 \text{ nmol L}^{-1}$ .

**Tabela 4.** Dados das equações das curvas analíticas obtidas com o ECV.

Faixa linear de concentração	Intercepto / $\mu\text{A}$	S / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	$R^2$
0,04 a $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,357	0,795	0,9902
0,3 a $7,93 \mu\text{mol L}^{-1}$	0,452	0,659	0,9972

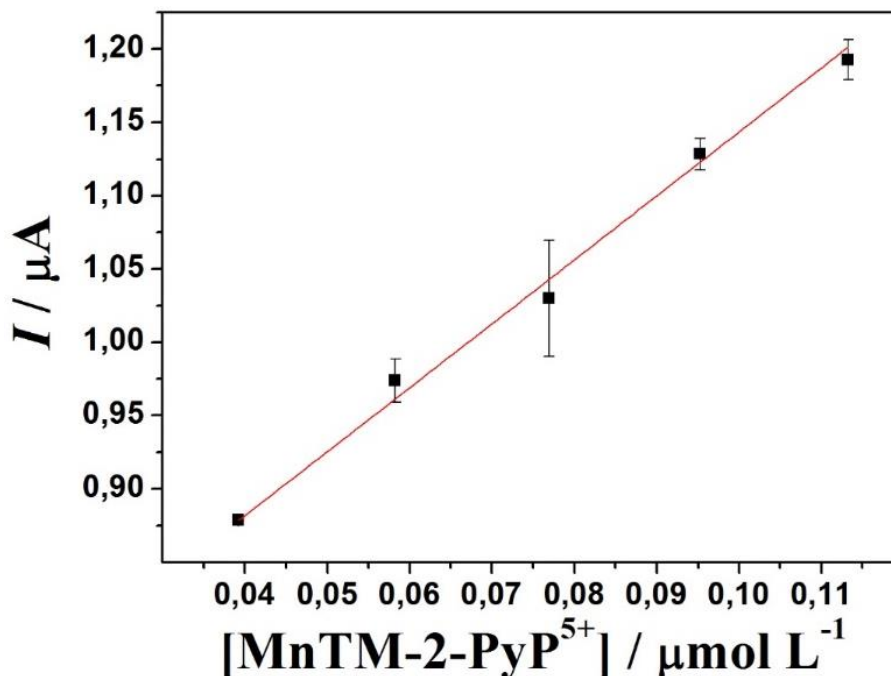
S: sensibilidade (coeficiente angular).

A Figura 28 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando o EPCNTC.



**Figura 28** - Voltamogramas de onda quadrada para sucessivas adições de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  utilizando EPCNTC em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ,  $f = 75 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ .

Assim como para o ECV, foi observado que a corrente de pico aumenta linearmente com o aumento da concentração na faixa de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A Figura 29 apresenta a curva analítica obtida para a faixa linear de resposta.



**Figura 29** - Curva analítica obtida através das correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada na faixa linear de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando EPCNTC em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ,  $f = 75 \text{ Hz}$  e  $a = 50 \text{ mV}$ .

Na Tabela 5 estão os dados obtidos pela equação da reta na faixa linear de concentração da curva analítica realizada com o EPCNTC. Os limites de detecção e quantificação para o EPCNTC foram de 1,6  $\text{nmol L}^{-1}$  e 5,4  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 5** - Dados da equação da reta obtida para a faixa linear de concentração da curva analíticas realizada com o EPCNTC.

Faixa linear de concentração	Intercepto / $\mu\text{A}$	S / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	$R^2$
0,04 a 0,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,707	4,363	0,9982

S: sensibilidade (coeficiente angular).

A avaliação da significância e a falta de ajuste do modelo de regressão foram realizadas empregando o método ANOVA. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos pelo ANOVA para as curvas analíticas obtidas pelos dois eletrodos na faixa linear de 0,04 a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Tabela 6** - Resultados da análise de variância para as curvas analíticas obtida com o ECV e com o EPCNTC, na faixa linear de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

ANOVA	Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Estatística
	Regressão	$4,00 \times 10^{-3}$	1	$4,00 \times 10^{-3}$	6,59
	Resíduo	$0,61 \times 10^{-3}$	8	$0,61 \times 10^{-3}$	
ECV	Falta de ajuste	$0,09 \times 10^{-3}$	3	$0,03 \times 10^{-3}$	0,28
	Erro Puro	$0,52 \times 10^{-3}$	3	$0,10 \times 10^{-3}$	
	Total	$5,00 \times 10^{-3}$	9		
EPCNTC	Regressão	$102,60 \times 10^{-3}$	1	$102,60 \times 10^{-3}$	16,81
	Resíduo	$6,10 \times 10^{-3}$	8	$6,10 \times 10^{-3}$	
	Falta de ajuste	$4,00 \times 10^{-3}$	3	$1,30 \times 10^{-3}$	3,19
	Erro Puro	$2,10 \times 10^{-3}$	3	$0,42 \times 10^{-3}$	
	Total	$108,70 \times 10^{-3}$	9		

A significância dos modelos de regressão foi calculada pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática residual ( $MQ_{reg}/MQ_{re}$ ) e comparada com o valor de F tabelado a 95 % de confiança. O F tabelado para os graus de liberdade descritos pelo modelo é igual a 5,32, sendo os F calculados para ambos os modelos maiores que F tabelado, pode-se dizer que os resultados obtidos possuem significância elevada (BRUNS *et al.*, 2006).

A falta de ajuste do modelo de regressão linear foi calculada através da consideração a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste, e a média quadrática do erro puro, ( $MQ_{faj}/MQ_{ep}$ ). Para um modelo bem ajustado o valor do F calculado deve ser menor que o encontrado para os valores tabelados de F de Snedecor, para os graus de liberdade descritos

pelo modelo, a 95 % de confiança (BRUNS *et al.*, 2006). Assim, sendo F tabelado = 9,28 não há falta de ajuste para os modelos de regressão obtidos pelas curvas analíticas com os dois eletrodos. Uma vez que o F calculado para ambos os modelos é menor que o F tabelado.

Comparando as curvas analíticas obtidas com os dos dois eletrodos, é notável a diferença de sensibilidade entre o ECV e EPCNTC na mesma faixa linear de concentração, 0,795  $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  e 4,363  $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ , respectivamente. Quando comparado com os métodos cromatográficos empregados para a determinação de MnP, o método desenvolvido com ambos os eletrodos se destacam, uma vez que os valores de LD estão na mesma ordem de grandeza que os obtidos pelos métodos cromatográficos. A Tabela 7 apresenta os limites de quantificação obtidos com o método voltamétrico desenvolvido com os dois eletrodos, e os limites de quantificação reportados para os métodos cromatográficos (SPASOJEVIĆ *et al.*, 2008).

**Tabela 7** - Limites de detecção obtidos para o ECV e EPCNTC.

Métodos	LD/ nmol L <sup>-1</sup>	Matriz	Referência
VOQ - ECV	19	Aquosa	Este trabalho
VOQ - EPCNTC	1,6	Aquosa	Este trabalho
HPLC-MS/MS	0,5*	Plasma de camundongos	SPASOJEVIĆ <i>et al.</i> , 2008
HPLC-FLD	1,3*	Órgãos de camundongo	SPASOJEVIĆ <i>et al.</i> , 2008
Espectroscopia UV/vis	700**	<i>E. coli</i>	KOS <i>et al.</i> , 2009

\*os LD em nmol L<sup>-1</sup> foram calculadas com base nos LD dos artigos em ng/mL e ng/g.

\*\* LD estimada através da intensidade da banda Soret ( $\lambda_{\text{max}} \sim 460 \text{ nm}$ ) e sua absorvidade molar.

#### 4.2.5. Aplicação do método em amostras de biomassa fúngica

Uma vez conhecida a sensibilidade do método em solução aquosa, as amostras de biomassa da levedura *Saccharomices cerevisiae* foram empregadas como modelo celular para avaliar a influência de uma matriz biológica na determinação da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. Esse

modelo unicelular foi escolhido devido a fácil obtenção das células de levedura, através do fermento biológico, e de ser um sistema simples e já reconhecido pela sua importância econômica em processos biotecnológicos (Abreu *et al.*, 2015). Além disso, a determinação de MnP em modelo unicelular é de interesse interno do Grupo de Porfirinas Aplicadas a Problemas Químicos, Medicinais e Tecnológicos, UFPB.

As biomassas foram crescidas em meio YMA líquido por 72 horas, na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, para ser usada como sistema controle, e na presença de 20 µmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, concentração geralmente empregada nos experimentos em modelos de células de mamíferos *in vitro* e modelos unicelulares *in vivo* (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2016), e que não apresenta toxicidade para o crescimento do microrganismo. As biomassas resultantes apresentaram diferença visível na coloração (Figura 30), indicando que houve absorção da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> na biomassa crescida no meio contendo a MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, indicando que houve a absorção da mesma.

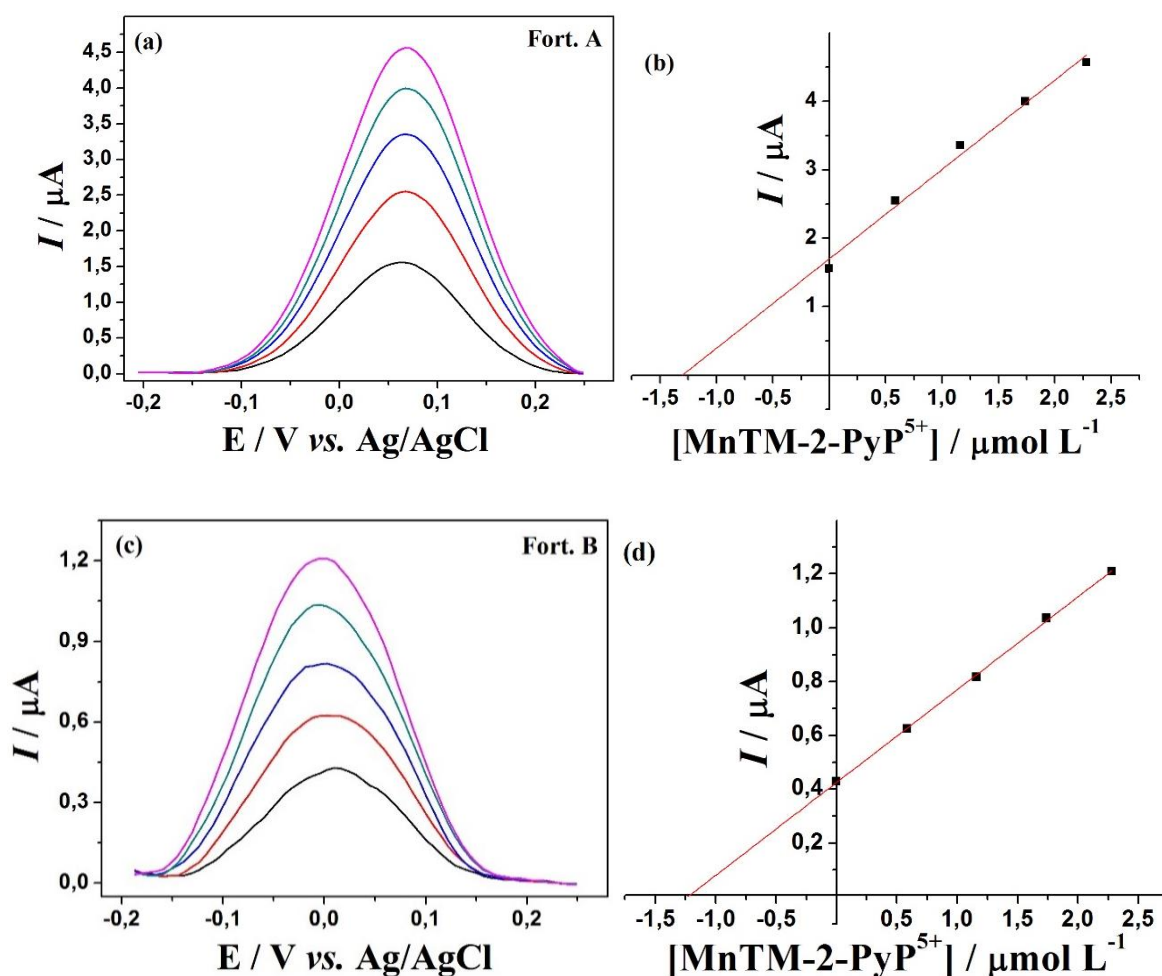


**Figura 30** – Biomassas resultantes após 72 horas de crescimento em meio YMA líquido com 20 µmol L<sup>-1</sup> MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> (esquerda) e na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> (direita).

Com as biomassas crescidas, foi realizado o preparo de amostra, baseado na extração da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> por meio do banho ultrassônico, após duas etapas de lavagem com tampão

fosfato gelado, para retirar excesso de meio de cultivo YMA, garantindo que a MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> quantificada fosse realmente a absorvida pelo fungo.

Para avaliar a exatidão do método, através de testes de recuperações aparente em amostras de biomassa crescida na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> e fortificadas com concentrações conhecidas de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, utilizando o método de adição de padrão. A Figura 31 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada amostra fortificada e suas respectivas curvas de adição de padrão.



**Figura 31** – Voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curva de adição de padrão para determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em amostra de biomassa fúngica fortificada com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, com (a) e (b) EPCNTC, (c) e (d) ECV em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, e NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

As equações referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa fortificadas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> estão apresentadas na Tabela 8. Nota-se que as sensibilidades dos dois eletrodos diminuíram bastante em relação à curva analítica obtida em solução aquosa. Porém, mesmo com uma menor sensibilidade, o método possui exatidão satisfatória, com valores de recuperação aparente na faixa de 110 a 117 %. Na Tabela 9 encontram-se os resultados da determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> nas amostras de biomassa crescida na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> e fortificadas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

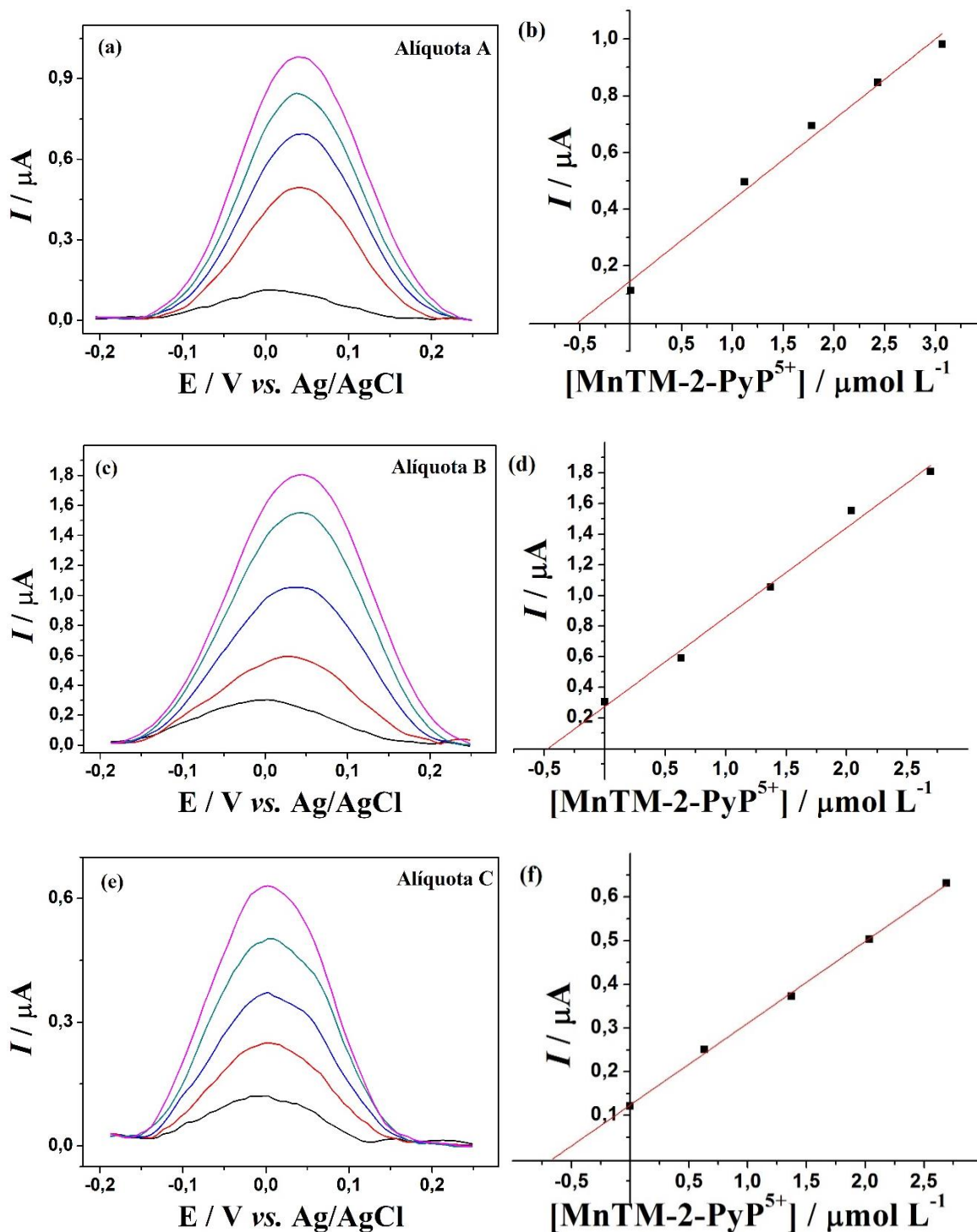
**Tabela 8** – Equações da reta referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa fortificadas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Amostra	Equação da reta
Fort. A	$I (\mu\text{A}) = 1,698(\mu\text{A}) + 1,305(\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}) \times C(\mu\text{mol L}^{-1}), R^2 = 0,9946$
Fort. B	$I (\mu\text{A}) = 0,4255(\mu\text{A}) + 0,3448(\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}) \times C(\mu\text{mol L}^{-1}), R^2 = 0,9993$

**Tabela 9** – Resultados dos ensaios de recuperação aparente para análise de amostras de biomassa crescida na ausência de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> e fortificadas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Amostra	Concentração adicionada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração determinada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Fort. A	1,18	1,30	110
Fort. B	1,05	1,23	117

Sabendo que a exatidão do método é satisfatória, foi realizada a determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> nas amostras de biomassa fúngica crescida na presença de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. A Figura 32 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada amostra de biomassa e suas respectivas curvas de adição de padrão.



**Figura 32** - Voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de adiao de padrão para determinaao de  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$  em alıquotas da biomassa fúngica crescida com  $\text{MnTM-2-PyP}^{5+}$ , analisada empregando EPCNTC (a, b, c, d), e ECV (e, f) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,8, e NaCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

As equações referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa crescidas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> estão apresentadas na Tabela 10. Na Tabela 11 encontram-se os resultados da determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> nas amostras de biomassa crescida com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>. A quantidade de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> por mg de biomassa úmida encontrada nas amostras crescidas por 72 h em meio contendo 20 μmol L<sup>-1</sup> de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> foi de 0,08 - 0,13 μmol mg<sup>-1</sup>.

**Tabela 10-** Equações da reta referentes às adições de padrão nas amostras de biomassa crescidas com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Alíquotas	Equação da reta
A	$I (\mu A) = 0,1486(\mu A) + 0,2838(\mu A L \mu mol^{-1}) \times C(\mu mol L^{-1}), R^2 = 0,9848$
B	$I (\mu A) = 0,2738(\mu A) + 0,5846(\mu A L \mu mol^{-1}) \times C(\mu mol L^{-1}), R^2 = 0,9891$
C	$I (\mu A) = 0,1235(\mu A) + 0,18735(\mu A L \mu mol^{-1}) \times C(\mu mol L^{-1}), R^2 = 0,9986$

**Tabela 11** – Resultados dos ensaios para análise de amostras de biomassa crescida com MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Amostra	Massa de biomassa úmida (mg)	Concentração encontrada (μmol mg <sup>-1</sup> )
A	17,07	0,11
B	17,47	0,08
C	16,35	0,13

## 5 CONCLUSÕES

Entre as técnicas de pulso avaliadas, a voltametria de onda quadrada apresentou uma alta sensibilidade ao analito, MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>.

Os eletrodos à base de carbono avaliados tiveram desempenho satisfatório na detecção da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, destacando-se o eletrodo de pasta de carbono e nanotubos de carbono.

Mesmo com a menor sensibilidade do eletrodo de carbono vítreo em relação ao eletrodo de pasta de carbono e nanotubos de carbono, foi possível desenvolver um método com limites de detecção e de quantificação de 19 nmol L<sup>-1</sup> e 64 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, em meio aquoso.

Aliando-se a sensibilidade da técnica e do eletrodo de pasta de carbono e nanotubos de carbono, com a otimização dos parâmetros voltamétricos da técnica, foi desenvolvido um método eletroanalítico com baixos limites de detecção e quantificação, 1,6 nmol L<sup>-1</sup> e 5,4 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, em meio aquoso.

O método desenvolvido, apresenta limites de detecção e quantificação satisfatórios, próximos aos obtidos pelos métodos cromatográficos, e se destaca por necessitar de um preparo de amostras simples e de baixo custo, quando comparado aos métodos cromatográficos. Além disso, o método possui uma exatidão aceitável para a determinação de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em amostras de biomassa fúngica, podendo ser aplicado para a análise em outros tipos de amostra biológicas mais complexas, adequando-se o preparo da amostra.

### 5.1 Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras para trabalho, incluem-se:

- Aplicar o método de análise na avaliação do crescimento da biomassa em diferentes tempos, para obter informações sobre a incorporação (“*uptake*”) de MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> durante o crescimento da biomassa.
- Determinar MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> em outros tipos de amostras biológicas, como tecido de órgão de ratos.

- Avaliar a aplicação do método para a determinação da MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>, uma vez que essa porfirina se assemelha estruturalmente com a MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, e possui potencial de  $E_{1/2} = 220$  mV *vs.* NHE muito próximo ao da MnTM-2-PyP<sup>5+</sup> ( $E_{1/2} = 222$  mV *vs.* NHE) (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010).

## REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S., ROVIDA, A., F. S., PAMPHILE, J. A.; **Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas**; *Uningá Review*, 21, 55-59, 2015.

ADLER, A. D., LONGO, F. R., SHERGALIS, W., **Mechanistic investigations of porphyrin syntheses, I. Preliminary Studies on ms-Tetraphenylporphin**, *J. Org. Chem.*, 32, 476, 1964.

BARD, A.J. & FAULKNER, L.R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: Chichester , John Wiley & Sons, 1980. 718.

BARROS, V. P., **Caracterização eletroquímica de metaloporfirinas e imobilização em filmes de pirrol eletropolimerizados: preparação e aplicação**, Dissertação de mestrado, USP, 2003.

BATINIĆ-HABERLE, I., REBOUÇAS, J. S. SPASOJEVIĆ, I.; **Redox-Active Therapeutics**; *Humana Press*, 2016.

BATINIĆ-HABERLE, I., TOVMASYAN, A., SPASOJEVIĆ, I.; **An Educational Overview of the Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Aspects of Mn Porphyrins - From Superoxide Dismutation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Driven Pathways**, *Redox Biology*, 5, 43–65, 2015.

BATINIĆ-HABERLE, I., RAJIC, Z., TOVMASYAN, A., REBOUÇAS J.S., YE, X., LEONG, K. W., DEWHIRST, M. W., VUJASKOVIC, Z., BENOVO, L., SPASOJEVIĆ, I.; **Diverse Functions of Cationic Mn(III) N-substituted Pyridylporphyrins, Recognized as SOD Mimics**; *Free Radic Biol Med*, 51, 1035-1053, 2011.

BATINIĆ-HABERLE, I., REBOUÇAS J.S., SPASOJEVIĆ, I.; **Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential**; *Antioxid. Redox Signal.*, 13, n° 6, 879-889,2010.

BATINIC-HABERLE, I.; SPASOJEVIC, I.; STEVENS, R. D.; HAMBRIGHT, P.; FRIDOVICH, I., **Manganese(III) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of O<sub>2</sub><sup>-</sup> dismutation**, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2689–2696, 2002.

BATINIC-HABERLE, I.; SPASOJEVIC, I.; HAMBRIGT, P.; BENOVA, L.; CMMBLISS, A. L.; FRIDOVICH, I.; **Relationship among redox potentials, proton dissociation constants of pyrrolic nitrogens, and in vivo and in vitro superoxide dismutating activities of manganese(III) and iron(III) water-soluble porphyrins**; *Inorg. Chem.*, 38, 4011-4022, 1999.

BATINIC-HABERLE, I., BENOVA, L., SPASOJEVIC, I., FRIDOVICH, I., **The ortho effect makes manganese(III) meso-tetrakis(N-methylpyridinium-2-yl)porphyrin a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic**; *J Biol Chem.*, 273:24521–8, 1998.

BORG, D. C., FAJER, J., FELTON, R. H., DOLPHIN, D., **The  $\pi$ -cation radical of chlorophyll a\***, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 67, No. 2, 813-820, 1970.

BOTTINO, R., BALAMURUGAN, A. N., TSE, H., THIRUNAVUKKARASU, C., GE, X., PROFOZICH, J., MILTON, M., ZIEGENFUSS, A.; TRUCCO, M., PIGANELLI, J. D., **Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment**. *Diabetes*, 53, 2559–2568; 2004

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

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARRAS NETO, B.; **Statistical desing – Chemometrics**; Elsevier, 2006.

CHRISTIE, J. H., TURNER, J. A., OSTERYOUNG, R. A.; **Square wave voltammetry at dropping mercury electrode: theory**; *Anal. Chem.*, 49, 1899- 1903, 1977.

DAUPHIN-DUCHARME, P., ARROYO-CURRAS, N., KURNIK, M., ORTEGA, G., LI, H., PLAXCO, K. W.; **A Simulation-based Approach to Determining Electron Transfer Rates using Square-Wave Voltammetry**; *Langmuir*, 33, 4407-4413, 2017.

FAULKNER, K. M., LIOCHEV S. I., FRIDOVICH, I., **Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo**, *J Biol Chem.*, 1994, 269:23471–6.

GALLI, A., SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H., AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S., **Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos**. *Quim. Nova*, 29, No. 1, 105-112, 2006.

GROVER, N.; SANKAR, M.; SONG, Y.; KADISH, K. M.; **Asymmetrically Crowded “Push–Pull” Octaphenylporphyrins with Modulated Frontier Orbitals: Syntheses, Photophysical, and Electrochemical Redox Properties**; *Inorg. Chem.*, 55, 584-597, 2016.

GUIDE, R. V.C., ANDRICOPULO, A. D., OLIVA, G., **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas**, *Estud. av.*, 2010, 24, n° 70, 81-98;

HAMBRIGHT, P., ADEYEMO, A., SHAMIN, A., LEMELLE, S., **[[4,4'4'',4''']-porphyrin-5,10,15,20-tetrayltetrakis(1-methylpyridiniumato)(2-)]-indium(III) pentachlorate**, *Inorg. Synth.*, 23, 1985, 55-59;

JARAMILLO, M. C., FRYE, J. B., CRAPO, J. D., BRIEHL, M. M., TOME, M. E., **Increased manganese superoxide dismutase expression or treatment with manganese porphyrin potentiates dexamethasone-induced apoptosis in lymphoma cells**. *Cancer Res.*, 69, 5450–5457, 2009

KADISH, A. M, CAEMELBECKE, E. V.; **Electrochemistry of Metalloporphyrins in Nonaqueous Media**; Encyclopedia of Electrochemistry, Wiley-VCH, 2007.

KOS, I., BENOVA, L., SPASOJEVIĆ, I., REBOUÇAS, J. S., BATINIĆ-HABERLE, I.; **High Lipophilicity of meta Mn(III) N-Alkylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimics Compensates for Their Lower Antioxidant Potency and Makes Them as Effective as Ortho Analogues in Protecting Superoxide Dismutase-Deficient Escherichia coli**, *J. Med. Chem.*, 52, 7868–7872, 2009.

KÜHNLEIN, R. P., **Drosophila as a lipotoxicity model organism – more than a promise?**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1801, 2010, 215-221.

LI, A. M., MARTINS, J., TOVMASYAN, A., VALENTINE, J. S., BATINIĆ-HABERLE, I., SPASOJEVIĆ, I., GRALLA, E. B.; **Differential Localization and Potency of Manganese Porphyrin Superoxide Dismutase-Mimicking Compounds in Saccharomyces Cerevisiae**, *Redox Biology*, 3, 1–6, 2014.

MAIA, C. G. C., **Otimização da síntese da meso-tetraqui(2-piridil)porfirina e estudos de Mn e Fe-porfirinas como modelos biomiméticos de catalase**, Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2015.

MAO, X. W., CRAPO, J. D., MEKONNEN, T., LINDSEY, N., MARTINEZ, P., GRIDLEY, D. S., SLATER, J. M., **Radioprotective effect of a metalloporphyrin compound in rat eye model.** *Curr. Eye Res.*, 34, 62–72; 2009

MARTÍN, J. F. G., GUILLEMENT, L., FENG, C., SUN, D.W.; **Cell Viability and Proteins Release during Ultrasound-Assisted Yeast Lysis of Light Lees in Model Wine;** *Food Chem*, 141, 934-939, 2013.

McCORD J. M., FRIDOVICH I., **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein),** *J Biol Chem.*, 1969; 244:6049–55.

OSTERYOUNG, J., OSTERYOUNG, R.; **Square wave voltammetry.** *Anal. Chem.*, 57, 101-110, 1985.

PACHECO, W. F., SEMAAN, F. S, ALMEIDA, V. G. K., RITTA, A. G. S. L., AUCÉLIO, R. Q., **Voltamétrias: Uma Breve revisão Sobre os Conceitos,** *Rev. Virtual Quim.*, 5, 516-537, 2013.

PIGANELLI, J. D., FLORES, S. C., CRUZ, C., KOEPP, J., YOUNG, R., BRADLEY, B., KACHADOURIAN, R., BATINIC-HABERLE, I., HASKINS, K., **A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic (SOD mimetic) inhibits autoimmune diabetes.** *Diabetes*, 51: 347–355; 2002

PINTO, V. H. A.; **Mn(III)-porfirinas como catalisadores biomiméticos: Estabilidade térmica e imobilização em vermiculita e sílica gel funcionalizada para hidroxilação de alcanos,** Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, 2013.

PASTERNAK, R. F., HALLIWELL, B., **Superoxide dismutase activities of an iron porphyrin and other iron complexes,** *J Am Chem Soc.*, 1979, 101:1026–31.

RAJIC, Z., TOVMASYAN, A., SANTANA, O. L., PEIXOTO, I. N., SPASOJEVIĆ, I., MONTE, S. A., VENTURA, E., REBOUÇAS, J. S., BATINIĆ-HABERLE, I.; **Challenges encountered during development of Mn porphyrin-based, potent redox-active drug superoxide dismutase mimic, MnTnBuOE-2-PyP<sup>5+</sup>, and its alkoxyalkyl analogues;** *J. Inorg. Biochem.*, 169, 50-60, 2017.

RAJIC, Z., TOVMASYAN, A., SPASOJEVIC, I., SHENG, H., LU, M., LI, A. M., GRALLA, E. B., WARNER, D. S., BENOVA, L., BATINIC-HABERLE, I.; **A new SOD**

**mimica, Mn(III) ortho N-butoxyethylpyridylporphyrin, combines superb potency and lipophilicity with low toxicity; *Free Radical Biol. Med.*, 52, 1828-1834, 2012**

RAMALEY, L., KRAUSE JÚNIOR, M. S.; **Theory of square wave voltammetry; *Anal. Chem.*, 41, 1362-1365, 1969.**

RAMALEY, L., KRAUSE JÚNIOR, M. S.; **Analytical application of square wave voltammetry. *Anal. Chem.*, 41, 1365-1369, 1969.**

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I.; TJAHOJONO, D. H.; RICHAUD, A.; MÉNDEZ, F.; BENOVA, L.; BATICIĆ-HARBELE, I.; **Redox Modulation of Oxidative Stress by Mn Porphyrin-Based Therapeutics: The Effect of Charge Distribution, *Dalton Trans.*, 1233-1242, 2008 (a).**

REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATICIĆ-HARBELE, I.; **Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes; *J. Pharm. Bio. Anal.*, 48, 1046-1049, 2008 (b).**

SÁFAR, G.A. M.; MARTINS, D. C. S.; DEFREITAS-SILVA, G.; REBOUÇAS, J. S.; IDEMORI, Y. M.; RIGHI, A.; **Interactions of porphyrins and single walled carbon nanotubes: A fine duet; *Synth. Met.*, 193, 64-70, 2014.**

SÁFAR, G. A. M.; BARROS, W. P.; IDEMORI, Y. M.; CARVALHODA-SILVA, D.; MENDES, J. B. S.; SINNECKER, E. H. C. P.; REBOUÇAS, J. S.; STUMPF, H. O.; **Multiple magnetic characteristics in pure and Mn porphyrin-doped single-walled carbon nanotubes; *J. Nanopart. Res.*, 14, 912, 2012**

SHENG, H., ENGHILD, J., BOWLER, R., PATEL, M., CALVI, C. L., BATINIC-HABERLE, I., DAY, B. J., PEARLSTEIN, R. D., CRAPO, J. D., WARNER, D. S., **Effects of metalloporphyrin catalytic antioxidants in experimental brain ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 33:947–961; 2002**

SHENG, H., SPASOJEVIC, I., TSE, H. M., JUNG, J. Y., HONG, J., ZHANG, Z., PIGANELLI, J., BATINIC-HABERLE, I., WARNER, D. S., **Neuroprotective efficacy from a lipophilic redox-modulating MnPorphyrin, MnTnHex-2-PyP: rodent models of ischemic stroke and subarachnoid hemorrhage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2011.**

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J.; **Fundamentos de química analítica**, Tradução 8º ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2005, 1124p.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos**; *Quim. Nova*, 26, 81-89, 2003.

Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica, SBPPC, [www.sbppc.org.br/portal/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=14](http://www.sbppc.org.br/portal/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=14), 2017.

SPASOJEVIĆ, I, CHEN, Y., NOEL, T. J., FAN, P., ZHANG, L., REBOUÇAS, J. S., CLAIR, D. K. St., BATICIĆ-HARBELE, I.; **Pharmacokinetics of the potent redox-modulating manganese porphyrin MnTM-2-PyP<sup>5+</sup>, in plasma and major organs of B6C3F1 mice**; *Free Radic Biol Med.*, 45, 943-949, 2008.

SOMPOL, P., ITTARAT, W., TANGPONG, J., CHEN, Y., DOUBINSKAIA, I., BATINIC-HABERLE, I., MOHAMMAD ABDUL, H., BUTTERFIELD, A., Clair, D. K. ST., **A neural model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury**. *Neuroscience*, 153:120–130; 2008.

SUNDARI, A.; PALANIAPPAN, S.P.; MANISANKAR, P.; **Enhanced sensing of Carbendazim, a Fungicide on Functionalized Multiwalled Carbon Nanotube Modified glassy Carbon Electrode and its Determination in Real Samples**; *Anal. Letters*, 43, 1.457-1.470, 2010.

TANG, B., WANG, Y., ZHU, J., ZHAO, W., **Web resources for model organism studies**, *Genomics, Proteomics Bioinf.*, 13, 2015, 64-68.

TIAN, J., PEEHL, D. M., KNOX, S. J., **Metalloporphyrin synergizes with ascorbic acid to inhibit cancer cell growth through Fenton chemistry**. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25, 439–447; 2010.

TOVAMASYAN, A., CARBALLAL, S., GHAZARYAN, R., MELIKYAN, L., WEITNER, T., MAIA, C. G. C., REBOUÇAS, J. S., RADI, R., SPASOJEVIC, I., BENOVA, L., BATINIC-HABERLE, I., **Rational design of superoxide dismutase (SOD) mimics: The evaluation of the therapeutic potential of new cationic Mn porphyrin with linear and cyclic substituents**, *Inorg. Chem.*, 53, 11467-11483, 2014.

TOVAMASYAN, A., SHENG, H., WEITNER, T., ARULPRAGASAM, A., LU, M., WARNER, D. S., VUJASKOVIC, Z., SPASOJEVIC, BATIĆ-HARBELE, I.; **Desing, Mechanism of Action, Bioavailability and therapeutic Effects of Mn Porphyrin-Based redox Modulators**; *Med. Princ. Pract.*, 22, 103-130, 2013.

WANG, J; **Analytical Electrochemistry**. Hoboken, New York: John Wiley, 2006. 250p.

WEITNER, T.; KOS, I.; MANDIC, Z.; BATINIC-HABERLE, I.; BIRUS, M.; **Acid-based and Electrochemical Properties of Manganese *meso*(*ortho*- and *meta*-*N*-ethylpyridyl)porphyrins: Voltammetric and Chronocoulometric Study of Protolytic and Redox Equilibria**; *Dalton Trans.*, 42, 14757-14765, 2013.

WEITNER, T.; BUDIMIR, A.; KOS, I.; BATINIC-HABERLE, I.; BIRUS, M.; **Acid-base and electrochemical properties of manganese *meso*(*ortho*- and *meta*-*N*-ethylpyridyl)porphyrins: Potentiometric, spectrophotometric and spectroelectrochemical study of protolytic and redox equilibria**; *Dalton Trans.*, 48, 11568-11576, 2010.

World Health Organization, **Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products**, WHO Technical Report Series, No. 850, 1995, Annex 3.

WIJESEKERA, T. P.; DOLPHIN, D. **Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry**, em: SHELDON, R. A. (Ed.), **Metalloporphyrin in catalytic oxidations**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 7, p. 193-239.

YE, X.; FELS, D., TOVMASYAN, A., AIRD, K., DEDEUGD, C., ALLENSWORTH, J. L., KOS, I., PARK, W., SPASOJEVIC, I., DEVI, G., DEWHIRST, M. W., LEONG, K., BATINIC-HABERLE, I., **Cytotoxic effects of differently redox-able Mn(III) *N*-alkylpyridylporphyrins in the presence of cellular reductant, ascorbate**. *Free Radic. Res.*, 45 (11-12), 1289-1306, 2011.

ZACHOWSKI, E. J., WOJCIECHOWSKI, M., OSTERYOUNG, J.; **The analytical application of square-wave voltammetry**. *Anal. Chim. Acta*, 183, 47-57, 1986.

ZHAO, Y., CHAISWING, L., OBERLEY, T. D., BATINIC-HABERLE, I., ST. CLAIR, W., EPSTEIN, C. J., ST. CLAIR, D., **A mechanism-based antioxidant approach for the reduction of skin carcinogenesis**. *Cancer Res.*, 65,1401–1405; 2005.