Universidade de São Paulo

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Thiago Martimiano do Prado

Estudo espectroeletroquímico do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico e suas interferências
na absorção de ferro *in vitro*

São Carlos

2017

Thiago Martimiano do Prado

Estudo espectroeletroquímico do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico e suas interferências na absorção de ferro *in vitro*

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antonio Spinola Machado

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra à toda minha família, pois esta é minha fortaleza e meu porto seguro. De maneira especial à:

Minha esposa Carolina e minha filha Valentina, mulheres da minha vida e combustíveis de minha luta diária para um futuro melhor;

Meus pais José e Lusia, sempre presentes em minha caminhada e referências de generosidade, respeito e humildade;

Minhas irmãs, Conceição, Angela e Sandra, amigas para sempre e torcedoras de cada conquista que alcanço;

Meus sobrinhos Victor, Júlia, Enzo e Nathan, motivo de alegria e razão para que eu me esforce para ser um bom exemplo;

Meu sogro e minha sogra Atílio e Rafaela, segundos pai e mãe, sempre presentes e confiantes na superação de cada desafio;

Meus avôs Silvestre e Eugênio (in memória) e minhas avós Isaura e Maria Joanna (in memória);

Meus cunhados, Valdemir, Will e Júlio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e pela saúde concedida para a conclusão desta etapa de minha trajetória.

Ao professor Dr. Sérgio Antonio Spinola Machado, pela orientação e a boa convivência durante todo o período do doutorado.

Aos colegas presentes e aos que estiveram no Grupo de materiais eletroquímicos e métodos eletroanalíticos (GMEME) no período de 2013 a 2017.

Aos funcionários da CAQI.

À todos os funcionários envolvidos para a manutenção da infra-estrutura do IQSC.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, FAPESP e CNPq.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”. (Albert Einstein)

RESUMO

Os comportamentos espectroeletroquímicos do ácido acetilsalicílico e seu produto de hidrólise, o ácido salicílico, foram estudados em soluções aquosas com *pH* ácido, neutro e alcalino. Resultados para experimentos de voltametria cíclica sugeriram possíveis processos de eletro-oxidação e eletro-redução dos fármacos. O monitoramento do espectro de absorbância na região do UV-vis, simultâneo à medida de carga envolvida na eletrólise, permitiu a identificação de processos redox e o cálculo do número de elétrons envolvidos, aplicando a Lei de Faraday. O fármaco mostrou-se estável em *pH* ácido, reduziu em *pH* neutro formando o radical acetilsalicilato e oxidou em *pH* alcalino gerando o 2,2'-bifenol como produto majoritário. Tanto no processo de eletro-redução como na eletro-oxidação, os mecanismos propostos estabelecem o envolvimento de 1 elétron para a identificação de mudanças no nível molecular. Estas mudanças foram observadas pelas alterações de espectros de absorbância na região do UV-vis. Técnicas complementares, ressonância paramagnética eletrônica e espectroscopia de transmitância FT-IR, foram usadas para a caracterização dos produtos obtidos em experimentos de eletrólise.

As respostas espectrofotométricas associadas à processos eletroquímicos permitiram o desenvolvimento de método espectroeletroquímico para a detecção do fármaco em amostras reais contidas em soluções com *pH* neutro, utilizando a técnica de voltabsorimetria derivada linear com limite de detecção de $0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A interação entre os fármacos e íons de ferro no ambiente do estômago foi simulada em experimentos *in vitro*, empregando eletroquímica e espectrofotometria. Na presença do AAS ocorreram interações fracas sem a interferência para a absorção de ferro pelo organismo. Em contrapartida, o AS interagiu formando um complexo estável com o Fe^{3+} ($K = 9,0 \times 10^{-4}$), podendo ser apontado como um potencial interferente para a absorção de ferro provocando anemia em indivíduos vegetarianos que fazem uso contínuo deste fármaco.

ABSTRACT

The spectroelectrochemical behavior of acetylsalicylic acid and its spin off hydrolysis, salicylic acid, were studied in aqueous solutions in the acid, neutral and alkaline *pH*. Results for cyclic voltammetry experiments suggested a possible electro-oxidation and electro-reduction of the drugs. The monitoring of the absorbance spectra in the region of the UV-vis, simultaneously with the measurement of the charge involved in the electrolysis, allowed the identification of redox processes and the calculation of the number of electrons involved applying Faraday's Law. The drug was stable in acid solution, reduced in neutral solution generating radical acetylsalicylate and oxidized in alkaline solution generating the majority product 2,2'-byphenol. In electro-reduction and electro-oxidation processes, the proposed mechanisms establish the involvement of 1 electron to identify changes at the molecular level. These were observed by changes in absorbance spectra in the UV-vis region. Complementary techniques, electronic paramagnetic resonance and FT-IR transmittance spectroscopy were used to characterize the products obtained in electrolysis experiments.

The spectrophotometric responses associated to the electrochemical processes allowed the development of a spectroelectrochemical method for the detection of the drug in real samples contained in solutions with neutral *pH*, using the technique of derivative linear voltabsorptometry, with limit of detection 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

The interaction between drugs and iron ions in the stomach environment was simulated *in vitro* experiments using electrochemistry and spectrophotometry. In the presence of ASA, weak interactions occurred without interference for the absorption of iron by the organism. On the other hand, AS interacted to form a stable complex with Fe^{3+} ($K = 9.00 \times 10^{-4}$) and could be considered as a potential interfering agent for the iron absorption, causing anemia in vegetarian individuals who make continuous use of this drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Célula de transmissão espectroeletroquímica envolvendo difusão linear semi-infinita, com passagem do feixe de luz no eixo vertical	13
Figura 2 – Sistema de opticamente transparente de camada fina (perspectivas frontal e lateral); a) ponto de aplicação e sucção de solução, b) suportes espaçadores de teflon, c) lâminas de microscópio (1x3 polegadas), d) solução de teste, e) <i>minigríd</i> metálica (altura, 1cm), f) eixo do feixe de luz, g) eletrodos, auxiliar e de referência, h) compartimento contendo solução de teste.	14
Figura 3 – Modelo simplificado para a transição entre estados de energia em uma molécula ou átomo que absorve radiação.	15
Figura 4 – Ocorrência dos níveis de energia para os orbitais moleculares (a) e transições possíveis entre os níveis de energia (b).....	16
Figura 5 – Representação esquemática das transições combinadas para os níveis de energia vibracionais e eletrônicos.	17
Figura 6 – Orbitais moleculares do benzeno.	18
Figura 7 – Estados de energia para o benzeno.	19
Figura 8 – Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico, AAS.	26
Figura 9 – Potenciostato Autolab PGSTAT 128N.	45
Figura 10 – Equipamentos para medidas espectrofotométricas. A) espectrofotômetro Avaspec 2048; B) fonte de radiação UV-vis Avalight DHS.....	45
Figura 11 – Acessórios para medidas espectrofotométricas. A) suporte para cubetas; B) cabo de fibra óptica usado para conectar a fonte de radiação no suporte para cubeta.	46
Figura 12 – A) Sonda de transmissão com caminho óptico variável (0,5 a 10 mm). B) Especificações da sonda contendo materiais de revestimento e medidas nominais de cada estrutura do dispositivo ...	46
Figura 13 – Célula espectroeletroquímica, perfil em corte transversal.	46
Figura 14 – Sistema para medidas espectroeletroquímicas; a) computador; b) espectrofotômetro; c) fonte de luz; d) dispositivo para coleta de espectros; e) sonda UV-vis; f) suporte para cubeta empregada como célula espectroeletroquímica; g) potenciostato.	47
Figura 15 – Espectros de absorbância na região do UV-visível em de H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ (pH 1,0): (A) AAS, (B) AS e (C) AA.	51
Figura 16 – Espectros de absorbância na região do UV-visível em solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (pH 13,0): (A) AAS, (B) AS e (C) AA.....	52
Figura 17 – Espectros de absorbância na região do UV-visível em solução de KNO_3 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,6): (A) AAS, (B) AS e (C) AA.....	53
Figura 18 – Espectros de absorbância na região do UV-visível registrados em diferentes intervalos de tempo: (A) solução de KNO_3 0,1 mol L ⁻¹ , (B) H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ e (C) NaOH 0,02 mol L ⁻¹	55
Figura 19 – Voltamograma após 10 ciclos para a rede de platina em solução de H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ desaerada, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	57
Figura 20 – Voltamogramas para a rede de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em: a) H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ ; b) KNO_3 0,1 mol L ⁻¹ e c) NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura $0,01 \text{ V s}^{-1}$	59
Figura 21 – Voltamogramas para a rede de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 0,1 mol L ⁻¹ 0,1 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura $0,02 \text{ V s}^{-1}$	60
Figura 22 – a) Carga medida para AAS em rede de platina sob potencial controlado (+1,1 V); b) Espectros UV-visível em função do tempo. Eletrólito H_2SO_4 0,1 M.....	63
Figura 23 – a) Carga medida para AAS em <i>minigríd</i> de platina sob potencial controlado (+1,1 V), $t = 600 \text{ s}$; b) Espectros UV-visível em função do tempo. Eletrólito KNO_3 0,1 mol L ⁻¹	64
Figura 24 – a) Carga medida para AAS no <i>minigríd</i> de platina sob potencial controlado (-0,69 V); b) Espectros na região do UV-visível em função do tempo. Eletrólito KNO_3 0,1 mol L ⁻¹	66

Figura 25 – Espectros de absorvância na região do UV-visível coletados antes e após a coulometria. Experimento para a avaliação de estabilidade do ânion radical formado durante a eletrólise.	68
Figura 26 – Fórmula estrutural da molécula do DMPO.	69
Figura 27 – Espectro RPE para solução contendo o produto da eletrólise da forma iônica do AAS na presença de DMPO.	69
Figura 28 – Fórmula estrutural da molécula do [DMPO-OH] [•] . Em destaque átomos com núcleos paramagnéticos que influenciam na reposta do espectro RPE para o radical.	69
Figura 29 – Voltamogramas para a <i>minigrid</i> de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em KNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura 0,002 V s ⁻¹	71
Figura 30 – Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o material híbrido rGO/AuNPs.	72
Figura 31 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão: a) nanofolhas de grafeno; b) material compósito, rGO/AuNPs.	72
Figura 32 – Voltamogramas para <i>minigrid</i> de platina com e sem modificação na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em KNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura 0,002 V s ⁻¹	74
Figura 33 – Voltabsormogramas para AAS: a) ausente; b) 0,88 µmol L ⁻¹ ; c) 1,23 µmol L ⁻¹ ; d) 1,58 µmol L ⁻¹ ; e) 1,93 µmol L ⁻¹ ; f) 2,28 µmol L ⁻¹ ; g) 2,63 µmol L ⁻¹ ; h) 2,80 µmol L ⁻¹ . Eletrólito KNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , $\nu = 0,02$ V s ⁻¹ , $\lambda = 275$ nm. Inserção: regressão linear obtida para a curva de calibração.	75
Figura 34 – Localização do ponto de coleta das amostras de água no córrego Monjolinho. Cidade: São Carlos – SP, Brasil.	76
Figura 35 – a) Carga medida para AS ⁻ $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em <i>minigrid</i> de platina sob potencial controlado (+0,85 V), $t = 480$ s; b) Espectros na região do UV-visível em função do tempo. Eletrólito NaOH 0,1 mol L ⁻¹	79
Figura 36 – Solução amarela contida na célula espectroeletroquímica após experimento de eletrólise do AS ⁻ em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ . $E = +0,85$ V, $t = 480$ s.	81
Figura 37 – Espectros de absorvância na região do UV-vis para soluções padrão de AS ⁻ e 2,2'-bifenol ($2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) e produto da eletrólise do AS ⁻	83
Figura 38 – Sinais para a derivada de segunda ordem, referentes aos espectros de absorvância na região do UV-vis para soluções padrão de AS ⁻ e 2,2'-bifenol ($2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) e produto da eletrólise do AS ⁻	83
Figura 39 – Espectros FT-IR a) AAS; b) Produto da eletrólise do AAS em meio alcalino (2,2'-bifenol). Número de varreduras igual a 36 e resolução 4.0.	85
Figura 40 – Orbitais <i>d</i> e as respectivas distribuições de densidade eletrônica.	86
Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV-vis para uma solução de AAS 3×10^{-3} mol L ⁻¹ e um solução contendo AAS 3×10^{-3} mol L ⁻¹ e FeCl ₃ 1×10^{-3} mol L ⁻¹	88
Figura 42 – Espectros de absorção na região do UV-vis para uma solução de FeCl ₃ 1×10^{-3} mol L ⁻¹ ; AAS 3×10^{-3} mol L ⁻¹ ; e soluções contendo concentração fixa de FeCl ₃ 1×10^{-3} mol L ⁻¹ com variação na concentração de AAS (1×10^{-3} mol L ⁻¹ , 2×10^{-3} mol L ⁻¹ e 3×10^{-3} mol L ⁻¹).	89
Figura 43 – Voltamogramas para solução contendo FeCl ₃ e solução contendo FeCl ₃ na presença de AAS. Velocidade de varredura 0,02 V s ⁻¹	89
Figura 44 – Soluções antes e depois da formação do complexo: à esquerda solução de AS, antes da reação; à direita solução contendo o complexo formado pela reação do AS com FeCl ₃	91
Figura 45 – Espectros de absorvância na região do UV-vis para solução de AS, antes da reação; solução contendo o complexo formado pela reação do AS com FeCl ₃	91
Figura 46 – Estrutura molecular para o complexo formado entre o AS e Fe ³⁺	92
Figura 47 – Distribuição eletrônica dos elétrons do Fe ³⁺ nos orbitais com desdobramento de energia.	92
Figura 48 – Voltamogramas para solução contendo FeCl ₃ e soluções de FeCl ₃ com AS. Velocidade de varredura 0,02 V s ⁻¹	94

Figura 49 – Espectros de absorbância na região do visível para a forma reduzida do complexo em solução.....	95
Figura 50 – Espectros de transmitância FT-IR para o ácido salicílico e complexo formado.....	96
Figura 51 – Célula intestinal e proteínas envolvidas no processo de absorção do ferro.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Transições eletrônicas características de compostos orgânicos.....	16
Tabela 2 – Dados de comprimento de onda de absorção máxima para anéis benzênicos substituídos em função da acidez/basicidade do substituinte.	20
Tabela 3 – Dados de comprimento de onda de absorção máxima para anéis benzênicos substituídos em função do caráter doador/ acceptor de elétrons do substituinte.	21
Tabela 4 – Dados para comprimentos de onda em função da posição do substituinte no anel benzênico.	23
Tabela 6 – Valores de comprimento de onda para bandas de absorção do AAS e AS	54
Tabela 7 – Dados para a quantificação de AAS em amostras reais.	77
Tabela 8 – Relação entre as cores da luz absorvidas e as cores observadas para a análise de um composto por espectrofotometria na região do visível.	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Espectroscopia ultravioleta	15
1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	24
1.3 Ácido acetilsalicílico (AAS)	25
1.3.1 Quantificação espectroeletroquímica do ácido acetilsalicílico	28
1.3.2 Interação do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico com o ferro	30
1.4 Estado da arte	32
1.4.1 Estudos eletroquímicos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico.....	32
1.4.2 Estudos relacionados à complexação do ferro por ácido acetilsalicílico e salicílico...	40
1.5 Justificativa	41
2 OBJETIVOS	43
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1 Materiais e métodos	44
3.2 Síntese do material compósito rGO/AuNPs e modificação da <i>minigrd</i> de platina ...	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Espectrofotometria UV-visível.....	50
4.2. Eletroquímica	56
4.3 Espectroeletroquímica	60
4.3.1 Experimentos em meio ácido	62
4.3.2 Experimentos em meio neutro	63
4.3.2.1 Aplicação analítica sobre o comportamento espectroeletroquímico do AAS em meio neutro	71
4.3.3 Experimentos em meio alcalino	78
4.4 Experimentos investigativos sobre a formação de complexos de ferro com ácido salicílico e ácido acetilsalicílico	85
5 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and enviromental samples.	112
APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium.	120

1 INTRODUÇÃO

No desenvolvimento deste trabalho foi abordada a técnica espectroeletroquímica óptica UV-vis *in situ*. Para a aplicação da técnica é fundamental: que sejam conhecidas as características do eletrodo; o emprego de eletrólito adequado para as medidas simultâneas do sinais óptico e eletroquímico; assegurar que o analito seja estável na solução preparada para execução dos experimentos. Os possíveis produtos formados como espécies radicais foram investigados pela técnica de RPE.

A combinação de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas contribui para a elucidação de mecanismos de reação de transferência de elétrons e para a compreensão de estados moleculares fundamentais em interfaces eletrodo-solução. Esta associação é o que caracteriza a espectroeletroquímica. As técnicas espectroeletroquímicas geralmente são classificadas como *in situ* e *ex situ*. Nas técnicas *in situ* a análise ocorre na superfície do eletrodo imerso em solução contida na célula eletroquímica, sob potencial controlado e durante a passagem de corrente. Em técnicas *ex situ* o eletrodo é retirado da célula eletroquímica e submetido a análise no ar ou vácuo. Embora as técnicas *ex situ* permitam muitos tipos de análises que não são possíveis em solução, a natureza do eletrodo pode mudar significativamente após sua remoção da solução contida na célula eletroquímica ¹.

Existe uma variedade de técnicas espectroeletroquímicas *in situ* onde os processos investigados podem ser observados na solução adjacente ao eletrodo ou de forma heterogênea diretamente na superfície do eletrodo². Neste trabalho são abordadas as técnicas espectroeletroquímicas baseadas em espectrofotometria UV-vis (*in situ*) e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (*ex situ*).

As diferentes vertentes da espectroscopia tem como princípio a interação entre os fótons de luz com a matéria, ocorrendo absorção de energia. A diferença entre as técnicas de interesse para este trabalho está no monitoramento de fótons com energias distintas. Na espectrofotometria UV-vis, a energia para a excitação de um elétron na camada de valência do átomo é equivalente a energia de um fóton de luz visível ou na região do ultravioleta. Por outro lado, a energia necessária para excitar um elétron desemparelhado entre estados de *spin* quantizados em um radical, possui valor situado na região de microondas no espectro eletromagnético³.

Na abordagem para a espectrofotometria UV-vis, todos os materiais eletroativos mudam seu espectro após uma reação de transferência de elétrons, devido aos dois estados redox

diferentes possuírem números distintos de elétrons. Um material que tem ou transmite uma cor é chamado de cromóforo³. A concentração das espécies que absorvem luz na região UV-vis pode ser monitorada usando a Lei de Lambert-Beer (1):

$$A = b\epsilon C \quad (1)$$

Onde A é a absorbância monitorada em um determinado comprimento de onda (λ), ϵ é o coeficiente de absortividade molar, e b é caminho óptico. Desta forma, o uso da Lei de Lambert-Beer permite o monitoramento da quantidade de material formado durante um processo eletroquímico.

Sob o ponto de vista experimental, a espectroeletroquímica *ex situ* é muito mais fácil de ser realizada, sendo necessário a geração de um cromóforo durante uma reação no eletrodo de trabalho e em seguida transferi-lo para uma célula de espectrofotometria UV-vis convencional para as medidas de absorbância. O principal problema para a aplicação da espectroeletroquímica *in situ*, reside na passagem da radiação pela célula espectroeletroquímica sem interferências das paredes da célula, da solução e do eletrodo de trabalho. Por isso é necessário que a célula seja construída com quartzo e as soluções e o eletrodo de trabalho sejam opticamente transparentes.

Os eletrodos opticamente transparentes são conhecidos como OTE (singla do inglês, *optically transparent electrode*). O primeiro trabalho empregando um OTE foi realizado em 1964 por Kuwana *et al.*⁴, onde foi usada uma superfície de vidro recoberta com um filme fino de óxido de estanho para a determinação do mecanismo e cinética da oxidação do composto orgânico, *o*-toluidina. Outros tipos de OTEs foram desenvolvidos a partir disto como: filmes finos de platina “pintados” sobre vidro⁵, placas de germânio utilizados para espectroscopia no infra-vermelho (IV)⁶, filmes depositados por vapor de metais sobre substratos transparentes⁷ e *minigrids* metálicas⁸.

As *minigrids* utilizadas como OTEs podem ser construídas com Au, Pt, Ag, etc., em um arranjo com malhas contendo fios do metal que podem possuir de 40 a 800 fios/cm. A luz é transmitida através de buracos microscópicos existentes entre os fios. A *minigrid* comporta-se como um eletrodo planar, após a eletrólise transcorrer por um tempo suficiente para que a profundidade da camada de difusão se torne grande em comparação com as dimensões do fio e dos furos⁹.

A diversidade das aplicações de eletrodos na forma de *minigrids* metálicas na área de espectroeletroquímica é evidenciada por diversos trabalhos relevantes publicados, desde a década de 70 até a atualidade. O valor de potencial formal e o número de elétrons transferidos foram determinados com o uso de *minigrid* para eletro-oxidação de 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina em uma faixa de pH entre 2 e 8 por Wang e Yang¹⁰ e para o $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ por Yang e Ren¹¹, empregando técnicas espectroeletroquímicas. O comportamento espectroeletroquímico do citocromo C proveniente de coração de cavalo foi investigado durante o processo de transferência eletrônica para um *minigrad* de ouro, mediada pelos aminoácidos cisteína, histidina, metionina e triptofano, contribuindo para o entendimento de processos de transferência de elétrons de metalo-proteínas em sistemas biológicos¹². Neste contexto também foi estudado a transferência eletrônica heterogênea de hemoproteínas, como hemoglobina, mioglobina e o citocromo C em *minigrad* de platina com azul de metileno imobilizado¹³.

O *design* das células é um outro aspecto importante para o desenvolvimento de experimentos com espectroeletroquímica abordando espectroscopia UV-vis. Estes tipos de experimentos, podem ser realizados em dispositivos como o da Figura 1, onde é possível ocorrer a difusão linear semi-infinita de espécies eletroativas para a superfície do eletrodo¹⁴. Neste caso, a eletrólise ocorre em uma região de potencial limitada por difusão e as mudanças de absorvância são registradas em função do tempo.

Figura 1 – Célula de transmissão espectroeletroquímica envolvendo difusão linear semi-infinita, com passagem do feixe de luz no eixo vertical

Fonte: N. Winograd and T. Kuwana, *Electroanal Chem.*, 7, 1 (1974).

Um outro tipo de célula utilizado em experimentos de transmissão é baseado em um sistema de camada fina¹⁵ como ilustrado na Figura 2. Neste sistema o eletrodo de trabalho fica acondicionado em um compartimento com espessura que pode variar de 0,05 a 0,5 mm e em contato com uma solução contendo espécies eletroativas. O compartimento é preenchido por capilaridade e os eletrodos de referência e auxiliar ficam em contato com a solução do sistema

que atinge um compartimento mais largo da célula. Neste dispositivo é possível realizar experimentos por voltametria cíclica, eletrólise exaustiva e coulometria de forma simultânea à obtenção de espectros na região UV-vis. Os eletrodos de trabalho usados para célula da Figura 2, são conhecidos pela sigla OTTLE (do inglês, *optically transparent thin-layer electrodes*) e ao serem empregados neste sistema oferecem como vantagem o desempenho de eletrólise exaustiva em um curto período de tempo, e no caso de um sistema quimicamente reversível a solução atinge o equilíbrio com o potencial do eletrodo, permitindo a aquisição dos dados espectrais em uma condição estática¹.

Figura 2 – Sistema de opticamente transparente de camada fina (perspectivas frontal e lateral); a) ponto de aplicação e sucção de solução, b) suportes espaçadores de teflon, c) lâminas de microscópio (1x3 polegadas), d) solução de teste, e) *minigríd* metálica (altura, 1cm), f) eixo do feixe de luz, g) eletrodos, auxiliar e de referência, h) compartimento contendo solução de teste.

Fonte: W. R. Heineman, B. J. Norris, and J. F. Goelz, *Anal Chem.*, 47, 79 (1975).

Bard *et al.*¹ descrevem em sua obra os fundamentos e aplicações de diversas técnicas que podem ser associadas à eletroquímica para a obtenção de dados espectroeletroquímicos. Neste contexto destaca-se o uso dos fundamentos de espectroscopia vibracional, espectroscopias eletrônica e iônica, ressonância magnética, microbalança com cristal de quartzo e métodos com raios-X.

1.1 Espectroscopia ultravioleta

O estudo de espectros UV combinado com técnicas eletroquímicas em experimentos espectroeletroquímicos é fundamental para a proposta das etapas dos mecanismos de oxidação e redução do AAS, bem como para a suposição dos produtos e subprodutos formados.

A radiação ultravioleta é localizada na região do espectro eletromagnético com valores de comprimento de onda (λ) de 190 nm a 400 nm. As informações analíticas do espectro UV em conjunto com análises por infravermelho ou ressonância magnética nuclear (RMN) podem levar a propostas válidas para estruturas. No caso em que a radiação passa de forma contínua por um material transparente, parte desta radiação pode ser absorvida. Se isso ocorre em um prisma um espectro com “falhas” (*gaps*) é formado, comumente chamado de espectro de absorção. Como resultado desta absorção, átomos ou moléculas passam de um estado de menor energia para um estado de maior energia, Figura 3.

Figura 3 – Modelo simplificado para a transição entre estados de energia em uma molécula ou átomo que absorve radiação.

Fonte: autoria própria

Quando a molécula absorve energia, um elétron (e^-) é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado e com maior energia potencial. A transição mais provável, geralmente é de um orbital molecular HOMO (*highest energy occupied molecular orbital*) para um orbital molecular LUMO (*lowest energy unoccupied molecular orbital*). Na maioria das moléculas, as diferenças de energia entre os níveis eletrônicos variam de 125 a 650 kJ/mol¹⁶. Em grande parte das moléculas os orbitais moleculares ocupados de menor energia correspondem às ligações σ . Os orbitais π são minoria, estão em um nível de energia maior que os orbitais σ e possuem pares de e^- não compartilhados. Os orbitais não ligantes n existem com maior energia em relação aos orbitais σ e orbitais π . Os orbitais anti-ligantes, σ^* e π^* , são orbitais de maior energia em relação aos demais, Figura 4.

Figura 4 – Ocorrência dos níveis de energia para os orbitais moleculares (a) e transições possíveis entre os níveis de energia (b).

Fonte: autoria própria

Em todos os compostos os elétrons podem realizar várias das transições de energia possíveis, exceto no caso dos alcanos. A Tabela 1 mostra as mais importantes transições.

Tabela 1 – Transições eletrônicas características de compostos orgânicos

Transições	Ocorrência
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	Alcanos
$\sigma \rightarrow \pi^*$	Compostos carbonílicos
$\pi \rightarrow \pi^*$	Alcenos, compostos carbonílicos, alcinos, compostos azo, etc.
$n \rightarrow \sigma^*$	O, N, S e compostos de halogênios
$n \rightarrow \pi^*$	Compostos carbonílicos

Nem todas as transições possíveis podem ser observadas. Existem restrições designadas pelas regras de seleção. Uma importante regra de seleção afirma que transições envolvendo mudança no número quântico principal de spin de um elétron não é permitida ocorrer. Tais transições são chamadas de transições proibidas.

Transições formalmente proibidas pelas regras de seleção não são observadas com frequência. Apesar de tratamentos teóricos serem bastante aproximados, em alguns casos as transições proibidas são observadas com intensidade de absorção menor do que ocorre para as transições permitidas pelas regras de seleção. A transição $\sigma \rightarrow \pi^*$ é o tipo de transição proibida mais comum.

Estudos sobre a origem da estrutura da banda UV descrevem que para um átomo que absorve radiação na região UV, o espectro de absorção geralmente consiste em linhas estreitas, como se espera para um processo quantizado que ocorre entre dois níveis discretos de energia.

Contudo, para moléculas, a absorção no UV ocorre normalmente em intervalos amplos de comprimento de onda, por que moléculas em temperatura ambiente normalmente possuem diversos modo excitados de vibração e rotação. Consequentemente em uma molécula seus membros estão em diversos estados de excitação vibracional e rotacional. Os níveis de energia para estes estados são muito pouco espaçados, correspondendo a diferenças pouco consideráveis para os níveis eletrônicos. Os níveis rotacional e vibracional ficam “sobrepostos” nos níveis eletrônicos de forma que uma molécula possa conter excitações eletrônicas, vibracionais e rotacionais, simultaneamente, como mostrado na Figura 5.

Por isso existe a possibilidade de muitas transições. Cada transição eletrônica consiste em um vasto número de linhas espaçadas por uma pequena distância que tornando-se tais diferenças indistinguíveis em um espectrofotômetro convencional. Preferencialmente o equipamento traça uma “cobertura” ao longo de um padrão de forma que são observadas as transições combinadas no espectro UV, com a forma de uma banda com o centro correspondente ao comprimento de onda da maior transição.

Figura 5 – Representação esquemática das transições combinadas para os níveis de energia vibracionais e eletrônicos.

Fonte: autoria própria

De acordo com os princípios da espectroscopia, um grande número de moléculas tem a capacidade de absorver luz em um determinado comprimento de onda¹⁶. Além disso, a maior medida da absorção da luz, corresponde ao comprimento de onda onde o fenômeno ocorre de forma mais eficaz. Essas ideias nortearam a formulação da lei empírica de Lambert-Beer¹⁶. Poucos espectros são reproduzidos na literatura científica, sendo a maioria descrita por indicações do comprimento de onda máximo, $\lambda_{\max}$ e ϵ do pico de absorção principal.

Embora a absorção da radiação ultravioleta resulte da excitação de elétrons do estado fundamental para o estado excitado, os núcleos correspondentes a estes elétrons são mantidos juntos em ligações que desempenham função impotente para determinar o comprimento de onda da radiação que será absorvida. O núcleo determina a força de ligação dos elétrons, influenciando no *gap* de energia entre os estados fundamental e excitado. Por isso, a energia característica de uma transição ou o comprimento de onda da radiação absorvida são propriedades de um conjunto de átomos ao invés dos próprios elétrons. Um grupo de átomos que produz tal absorção é chamado de cromóforo¹⁶.

Ocorrem mudanças estruturais em um cromóforo, onde a intensidade e energia de absorção mudam exatamente como consequência de tais mudanças. Teoricamente, existe dificuldade em prever como a absorção mudará a estrutura de um cromóforo, sendo necessário a aplicação de dados oriundos de trabalhos empíricos como guias para a previsão de tais relações.

Em cromóforos aromáticos as absorções resultantes de transições podem ser bastante complexas. Para o benzeno, por exemplo, o espectro de absorção contém três bandas de absorção, as quais contém uma grande quantidade de estruturas finas. As transições eletrônicas são basicamente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, mas seus detalhes não são simples, Figura 6.

Figura 6 – Orbitais moleculares do benzeno.

Fonte: autoria própria.

Na Figura 6 é possível observar a existência de quatro transições possíveis, entretando, ambas com mesma energia. Assim poderia ser previsto a existência de apenas um pico de absorção no espectro ultravioleta do benzeno. Entretanto, os estados de energia de cada

transição ocorrem de forma diferenciada, devido às considerações feitas sobre a simetria e repulsões entre elétrons. A Figura 7 mostra os estados de energia do benzeno.

Figura 7 – Estados de energia para o benzeno.

Fonte: autoria própria.

A substituição no anel benzênico podem provocar os deslocamentos hipsocrômico e batocrômico. O deslocamento hipsocrômico consiste no aparecimento do pico de absorção máximo em comprimentos de ondas menores do que o usual, devido à presença de um substituinte na estrutura do cromóforo, e no deslocamento batocrômico o substituinte provoca o aparecimento do pico de absorção máximo em comprimentos de onda maiores do que o usual. Infelizmente a previsão destes deslocamentos é difícil de ser realizada e as informações relacionadas ao conhecimento qualitativo do efeito destas substituições pode ser classificado em grupos:

A. Substituintes com elétrons não compartilhados

Substituintes que carregam elétrons não compartilhados (elétrons n) podem provocar deslocamentos em bandas primárias e secundárias. Os elétrons não compartilhados aumentam a extensão do sistema π através da ressonância (Equação 2). Quanto maior for a disponibilidade de elétrons n para a interação com o sistema π do anel aromático, maior será o deslocamento. Interações entre elétrons n e π causam deslocamento nas bandas primárias e secundárias do anel do benzeno, no sentido de comprimentos de onda maiores (conjugação estendida). A presença de elétrons n no composto também possibilita as transições $n \rightarrow \pi^*$. Quando um elétron é excitado para π^* em um cromóforo, o átomo de onde foi removido torna-se elétron deficiente e o sistema π do anel, incluindo o substituinte adquire um elétron extra ocasionando a separação de carga apresentada na Equação 3 (o $*$ representa o elétron excitado).

Cada um dos estados excitados são chamados de estados de transferência de carga ou estado excitado elétron transferidor.

A mudança no *pH* pode provocar efeitos sobre o deslocamento da bandas primárias e secundárias em compostos que são ácidos ou básicos (vide Tabela 2).

Tabela 2 – Dados de comprimento de onda de absorção máxima para anéis benzênicos substituídos em função da acidez/basicidade do substituinte.

Substituinte	Banda primária		Banda secundária	
	λ / nm	ϵ	λ / nm	ϵ
-H	203,5	7400	254	204
-OH	210,5	6200	270	1450
-O ⁻	235	9400	287	2600
-NH ₂	230	8600	280	1430
-NH ₃ ⁺	203	7500	254	169
-COOH	230	11600	273	970
-COO ⁻	224	8700	268	560

B. Substituintes com capacidade de promover conjugações π

Substituinte propriamente cromóforos normalmente possuem elétrons π . Somente no caso dos elétrons n , a interação entre os elétrons do anel benzênico e os elétrons π do substituinte

podem produzir uma nova banda de transferência de elétrons. As vezes a banda pode ser tão intensa que encobre a banda secundária do sistema benzênico (Tabela 3). Esta interação induz a uma elétron deficiência no anel, Equação 4.

Tabela 3 – Dados de comprimento de onda de absorção máxima para anéis benzênicos substituídos em função do caráter doador/ aceitor de elétrons do substituinte.

Substituinte	Banda primária		Banda secundária	
	λ / nm	ϵ	λ / nm	ϵ
203,5	7400	254	204
-CH ₃	206,5	7000	261	225
-Cl	209,5	7400	263,5	190
-Br	210	7900	261	192
-OH	210,5	6200	270	1450
-OCH ₃	217	6400	269	1480
-NH ₂	230	8600	280	1430
-CN*	224	13000	271	1000
-COOH*	230	11600	-	970
-COCH ₃ *	245,5	9800	-	-
-CHO*	249,5	11400	-	-
-NO ₂ *	268,5	7800	-	-

* Substituintes retirantes de elétrons.

C. Efeitos da retirada e doação de elétrons

Os efeitos dos substituintes sobre a absorção máxima estão relacionados com a capacidade de retirar ou doar elétrons da estrutura do cromóforo. A presença de qualquer substituinte muda a primeira banda de absorção para comprimentos de onda maiores do que o comum, independente de sua influência sobre a distribuição de elétrons em qualquer posição

da molécula aromática. Grupos retirantes de elétrons não influenciam a banda secundária, exceto quando este grupo atua como cromóforo. Por outro lado, um grupo que doa elétrons provoca o aumento na intensidade e do valor do comprimento de onda máximo da banda de absorção secundária.

D. Derivados de benzeno dissubstituídos

Para benzenos dissubstituídos o efeito de cada um dos substituintes deve ser considerado. Para *para*-benzenos dissubstituídos existem duas possibilidades;

Se ambos os grupos doam elétrons ou retiram elétrons, seu efeitos são similares ao observados em benzenos monossubstituídos. O grupo mais forte é considerado como aquele que determina a extensão da mudança na banda de absorção.

Se um dos dois grupos doa elétrons e o outro grupo retira elétrons, a magnitude da mudança na banda primária é maior do que a soma das mudanças devido a presença dos grupos de forma individual. O reforço no deslocamento ocorre em função das interações de ressonância representadas na Equação 5.

Se dois grupos de um derivado de benzeno dissubstituído são cada um *orto* ou *meta* em relação ao outro, a magnitude da mudança é aproximadamente igual a soma das mudanças causadas individualmente pelos grupos. Neste caso não existe a possibilidade de ocorrer a interação de ressonância direta entre os grupos substituintes, como é observado para os substituintes *para*. Em substituintes *orto* e *meta* a ressonância é inibida pela incapacidade de ambos alcançarem a coplanaridade.

Existe uma correlação empírica entre a estrutura e a posição observada para a banda primária de absorção em derivados benzoicos substituídos, Tabela. 4. Desta forma é possível estimar a posição da banda primária para derivados de benzoíla. Dados experimentais mostram que há uma variação com cerca de 5 nm entre os dados tabelados e o que é observado na prática¹⁶.

Tabela 4 – Dados para comprimentos de onda em função da posição do substituinte no anel benzênico.

Cromóforo original:	Posição do substituinte	λ / nm
-	-
R = alquila ou resíduo de anel	-	246
R = H	-	250
R = OH ou O-alquila	-	230
Aumento para cada substituinte:	-	-
		$\Delta\lambda$ / nm
Alquila ou resíduo de anel	<i>o, m</i>	3
	<i>p</i>	10
-OH, -OCH ₃ ou -O-alquila	<i>o, m</i>	7
	<i>p</i>	25
-O-	<i>o</i>	11
	<i>m</i>	20
	<i>p</i>	78
-Cl	<i>o, m</i>	0
	<i>p</i>	10
-Br	<i>o, m</i>	2
-NH ₂	<i>o, m</i>	13
	<i>p</i>	58
-NHCOCH ₃	<i>o, m</i>	20
	<i>p</i>	45
-NHCH ₃	<i>p</i>	73
-N(CH ₃) ₂	<i>o, m</i>	20
	<i>p</i>	85

A abordagem do estudo com modelos compostos é a melhor forma de se trabalhar com a técnica de espectroscopia UV. Comparando o espectro UV de uma espécie desconhecida com o de uma substância similar, porém composta com menor quantidade de substituições; é possível determinar se ambas contém o mesmo cromóforo.

1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A existência de radicais muito reativos é provável apenas em soluções extremamente diluídas e sua presença pode ser comprovada devido às propriedades magnéticas apresentadas por elétrons desemparelhados. A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), é a técnica que pode ser utilizada para a detecção de espécies com 1 ou 2 elétrons desemparelhados. O método possui alta sensibilidade podendo detectar radicais em concentrações abaixo de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e fornecer informações sobre a natureza do radical e sua estrutura¹⁷. Neste trabalho a investigação sobre possíveis radicais formados durante a eletro-redução do AAS em meio neutro foi realizada por RPE.

A teoria associada à técnica parte do pressuposto que um elétron possui um momento magnético associado igual ao magneton de Bohr ($\mu_B = 9,27 \times 10^{-24} \text{ J. T}^{-1}$) e quando é submetido a um campo magnético externo com intensidade B_0 , esse momento magnético pode tomar orientação paralela ou anti-paralela em relação ao sentido do campo magnético externo. A orientação paralela encontra-se em estado de menor energia em relação a anti-paralela e esse fenômeno é conhecido como efeito Zeeman, onde a diferença de energia, ΔE entre os dois estados é dada em (6), sendo g_e a razão entre o momento magnético dipolar e o momento magnético angular do elétron (razão giromagnética)¹⁸.

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0 \quad (6)$$

Para mudar do nível de energia mais baixo para o mais alto, o elétron precisa absorver radiação eletromagnética ($h\nu$) com energia ΔE , conforme é descrito pela equação fundamental da espectroscopia RPE (7)¹⁸.

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0 \quad (7)$$

O centro paramagnético é submetido a um campo magnético, sendo provocada a ressonância do elétron entre os dois estados e a energia absorvida monitorada é convertida em um espectro de RPE. O elétron quando não é influenciado por um campo magnético externo possui o valor de g_e aproximadamente igual a 2,00. Nesta situação quando é submetido a uma radiação com frequência de 9,5 GHz, ocorre ressonância por volta de 3400 G.

O ganho ou perda de momento angular é conhecido como acoplamento *spin*-órbita e afeta o valor de g resultando em valores diferentes de 2,00. O fator g muda de acordo com a orientação de um átomo paramagnético em um campo magnético externo (aplicado). Esse

fenômeno é conhecido como anisotropia e depende da estrutura eletrônica do átomo em questão, uma vez que o momento angular do elétron não é igual para todas as orientações possíveis do átomo ou molécula no campo magnético. Baseado na anisotropia é possível obter informações sobre os orbitais que contêm o elétron desemparelhado¹⁸.

Se um átomo contendo um elétron desemparelhado possui o próprio *spin* nuclear diferente de zero, ele possui um pequeno campo magnético associado que também influencia o elétron. Neste caso acontece o fenômeno chamado de acoplamento hiperfino, sendo este análogo ao acoplamento que existe em RMN, causando o *splitting* de sinais em dubletos, tripletos, etc. Os centros paramagnéticos nunca estão isolados e dessa forma os elétrons a um dado momento estar em equilíbrio termodinâmico, ou seja, em diferentes estados energéticos. A descrição estatística da população de centro paramagnéticos é feita pela distribuição de Boltzmann (8)¹⁸, onde n_{MJ+1} é o número de centros paramagnéticos ocupando o nível de energia $MJ+1$, κ é a constante de Boltzmann ($1,28 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin.

$$\frac{n_{MJ+1}}{n_{MJ}} = \exp\left(-\frac{E_{MJ+1} - E_{MJ}}{\kappa T}\right) = \left(-\frac{\Delta E}{\kappa T}\right) \quad (8)$$

Quando a frequência empregada em experimentos de espectroscopia RPE possui valor de $\nu = 10 \text{ GHz}$, correspondente à banda-X, e em temperatura ambiente, o valor da razão na distribuição de Boltzmann é 0,998. Isso significa que existem mais elétrons no nível de energia mais baixo do que no nível mais alto. Para esse caso predomina a absorção de energia¹⁸.

Um espectro de absorbância RPE multi-alinhado é obtido quando existe o acoplamento hiperfino. Nesta condição, o espaçamento entre as linhas espectrais indica o grau de interação entre o elétron desemparelhado e os núcleos paramagnéticos. A constante de acoplamento hiperfino é relacionada ao espaçamento entre as linhas espectrais, podendo ser o próprio espaçamento nos casos mais simples. Esta constante de acoplamento hiperfino isotrópico representada por B , é utilizada para os casos onde que a interação entre o elétron e o núcleo ocorre de forma independente à orientação da amostra no campo magnético. A representação para constante de acoplamento hiperfino anisotrópico, a é utilizada nos casos em que tal interação depende da orientação da amostra em um campo magnético¹⁸.

1.3 Ácido acetilsalicílico (AAS)

O comportamento do AAS e seus produtos de hidrólise foi estudado em diferentes valores de pH , sendo estes relacionados às diferentes regiões do organismo. Assim foi atribuído;

às soluções ácidas ao suco gástrico presente no estômago, com pH 1,2 – 3,0 durante a primeira etapa de digestão do bolo alimentar, chamado quimo; às soluções neutras ao suco entérico com pH 7,0, presente na região de transição entre o estômago e o intestino delgado, o duodeno; às soluções alcalinas ao suco pancreático liberado no duodeno com pH 8,8 - 9,3, quando o quimo chega ao duodeno com pH abaixo 4,5 ¹⁹.

O AAS (Figura 8) é um fármaco que pertence à categoria dos anti-inflamatórios não esteroidais, AINEs, que possuem atividade terapêutica com efeitos anti-inflamatório, analgésico e anti-pirético. Os AINEs são amplamente usados para fins analgésicos em função de perturbações dolorosas, comumente nociceptivas (originadas de lesão ou disfunção do sistema nervoso central ou do sistema nervoso periférico)²⁰. São prescritos de forma alternativa aos glicocorticoides que diminuem a produção de fosfolipases, podendo resultar em efeitos colaterais como diabetes, catarata, glaucoma, osteoporose, obesidade, descamação da pele e aumento da suscetibilidade a infecções²¹. O efeito de alguns AINEs como o ácido acetilsalicílico (AAS), rofecoxibe e celecoxibe vêm sendo estudado na terapia de distúrbios tromboembólicos devido à sua ação vasodilatadora e antiagregante plaquetária ^{22; 23; 24}. Existem também, trabalhos relacionados ao emprego de AINEs no tratamento da doença de Alzheimer ^{25; 26; 27; 28; 29} e prevenção de alguns tipos de câncer como por exemplo, os que afetam a próstata ^{30; 31}, a pele (melanoma) ^{32; 33} e principalmente, o câncer colorretal ^{34; 35; 36; 37; 38}.

Figura 8 – Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico, AAS.

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de ação dos AINEs ocorre na inibição da atividade enzimática das ciclooxigenases (COX). As COX ou prostaglandina H2 sintetases (PGH2), funcionam como biomarcadores para a dor no organismo ³⁹ e são as enzimas que catalisam as duas primeiras etapas na biossíntese de prostaglandinas (PGs) à partir do ácido araquidônico, produzido através da atividade da fosfolipase sobre fosfolipídios presentes nas membranas celulares ⁴⁰

Em mamíferos podem ser encontrados dois tipos de COX (COX-1 e COX-2), com estruturas e atividades catalíticas muito similares⁴¹. A COX-1 é conhecida como ciclooxigenase constitutiva e está presente no estômago onde produz as prostaglandinas citoprotetoras (PGI₂ e PGE₂), reduzindo a secreção do suco gástrico e aumentando o fluxo sanguíneo na mucosa estomacal. Nos rins, as prostaglandinas, PGI₂, PGE₂ e PGD₂, possuem efeito vasodilator e são responsáveis pela manutenção do fluxo sanguíneo e melhor funcionamento em pacientes acometidos por insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática ou insuficiência renal⁴⁰. No sistema nervoso central, a COX-1 é encontrada em neurônios de todo o cérebro, com abundância no prosencéfalo, onde as prostaglandinas podem estar envolvidas em funções complexas e integrativas⁴². A COX-1 é expressa em células fetais e amnióticas, contribuindo com prostaglandinas para a manutenção de uma gravidez saudável⁴³; ela também é expressa no epitélio uterino no início da gestação e pode ser importante para a implantação do óvulo e para a angiogênese necessária para estabelecer a placenta⁴⁴.

As citocinas e mitógenos pró-inflamatórios, como a interleucina (IL)-1beta (IL-1β), o interferon gama e o fator de necrose tumoral alfa (FNT-α) induzem a COX-2^{45; 46}. Além disso, a expressão de COX-2 em macrófagos pode também ser estimulada pelo fator de ativação de plaquetas (FAP) e PGE₂.^{47; 48} Um papel chave para a COX-2 na inflamação das articulações é sugerido através da regulação da expressão da COX-2 pelas citocinas não apenas nos monócitos e macrófagos, mas também nos condrócitos, osteoblastos e células endoteliais dos microvasos sinoviais^{49; 50}. Por outro lado, a expressão reduzida de COX-2 ocorre após exposição às citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13, bem como dexametasona^{51; 52}. Como a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e citocinas, tem sido sugerido que as ações anti-inflamatórias dos AINEs são devidas à inibição da COX-2, ao passo que os efeitos colaterais indesejáveis, tais como lesão da mucosa gástrica e intestinal e toxicidade renal são devido à inibição da COX-1. Um grande conjunto de dados apoiam esta hipótese^{53; 54; 55}, que estimulou a busca de inibidores seletivos de COX-2, por exemplo AINEs potencialmente gastro-seguros.

O AAS é rapidamente hidrolisado *in vivo* originando o ácido salicílico e o ácido acético, Equação 9. O fármaco apresenta-se sob a forma de um pó branco ou cristais brancos e pode ter um ligeiro odor. Quando comercializado como medicamento é encontrado em comprimidos. Os comprimidos são parcialmente solúveis em água e completamente solúveis em álcool; seu pK_a é 3,5. Cada grama de ácido acetilsalicílico contém cerca de 760 mg de salicilato. O efeito adverso mais comum em doses terapêuticas é relacionado a distúrbios gastrointestinais. O nível recomendado para a dosagem no sangue para efeito analgésico é de 20 – 100 µg / mL (0,11 –

0,56 mM)⁵⁶. A estabilidade do AAS em comprimidos é máxima em valores de pH entre 2 e 3, intermediária em pH entre 4 e 8, e mínima em pH superior a 8⁵⁷.

(9)

As soluções aquosas podem ser obtidas a partir de pós ou comprimidos em pH entre 6 e 7, onde são necessárias 10 horas para que 90% do AAS seja hidrolisado a temperatura ambiente⁵⁷.

1.3.1 Quantificação espectroeletroquímica do ácido acetilsalicílico

Os analgésicos são a classe mais popular de produtos farmacêuticos, sendo consumidos em grandes quantidades em todo o mundo. Entre eles o AAS é de longe, consumido em maior escala. Isso também está relacionado com suas propriedades medicinais para o tratamento de dor de cabeça (mesmo enxaqueca), dores musculares, artrite, dores de dente, dor nas costas, febre, gripe, distúrbios tromboembólicos, câncer colorretal, etc.^{58; 59} Outro fator que influencia o consumo demasiado do AAS é a permissão para o comércio em alguns países, sem a necessidade de prescrição por receituário médico. A quantidade de AAS comercializada é estimada em cerca de cem bilhões de comprimidos por ano.

No entanto, a geração do ácido salicílico via hidrólise em ambientes ácidos, como o estômago humano promove uma série de efeitos perigosos no corpo humano, incluindo úlceras gastrointestinais, tinnitus e síndrome de Reye⁶⁰. Para evitar a hidrólise no estômago, formulações com revestimentos entéricos estão disponíveis em comprimidos de liberação controlada, permitindo a absorção do fármaco no intestino. Supondo que apenas 40% das pílulas ingeridas sejam eliminadas do corpo em sua forma química original ou como metabólitos, o potencial de poluição desse medicamento é enorme. Vários estudos científicos indicam que os produtos farmacêuticos são um dos principais contaminantes nas águas ambientais, devido ao seu metabolismo parcial pelo corpo humano, subsequente excreção urinária ou fecal e sua remoção ineficiente da água nas estações de tratamento de esgoto^{61; 62};

⁶³. Além disso, um aumento na demanda pelo AAS leva ao aumento da produção, resultando em um maior volume de águas residuais contaminadas pelo fármaco.

No decorrer dos anos foram desenvolvidas técnicas analíticas para medir níveis de traço do AAS diretamente na água ou seus metabolitos em amostras de urina. Essas metodologias incluem técnicas como cromatografia líquida capilar⁶⁴, cromatografia líquida de alta performance^{65; 66}, fluorimetria⁶⁷ e voltametria^{68; 69} entre outras. A detecção do AAS de forma confiável em água natural está se tornando cada vez mais importante devido à sua toxicidade crônica e aos efeitos colaterais que podem ocorrer quando é ingerido continuamente.^{70; 71} O controle sobre a ingestão acidental do AAS é crucial em países tropicais, onde doenças que causam hemorragia generalizada, como infecção por zika vírus, dengue ou chikungunya, podem ser agravadas pela capacidade do AAS inibir a agregação plaquetária.^{72; 73; 74}

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo para identificar o AAS usando técnicas espectroelectroquímicas, considerando a necessidade de métodos para a detecção do fármaco não metabolizado em amostras ambientais neutras. A voltabsormetria derivada de varredura linear (DLVSA) foi adotada nesta proposta, uma vez que é considerada como uma técnica analítica mais sensível em aplicações que envolvem matrizes complexas em relação a outras técnicas eletroquímicas, como a voltametria. Em princípio, esta técnica combina sinais eletroquímicos e ópticos ao nível molecular, medindo a absorbância na região ultravioleta durante os processos de oxidação-redução⁷⁵.

O *minigrid* de platina adotado como eletrodo de trabalho foi modificado para a prevenção de envenenamento de sua superfície, em função de possíveis reações paralelas à eletro-redução do analito de interesse. Um material interessante que tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de sensores eletroanalíticos é o óxido de grafeno reduzido (rGO). O rGO tem características semelhantes às nanofolhas de grafeno, ou seja, uma estrutura bidimensional singular formada por algumas camadas de átomos de carbono sp^2 que geram um sistema π -conjugado com alta mobilidade de elétrons e transferência de carga rápida. O rGO pode servir como um suporte sólido para a imobilização de várias espécies e pode ser usado como plataforma para o desenvolvimento de biossensores e sensores, incluindo enzimas⁷⁶, DNA⁷⁷, biomarcador⁷⁸, pontos quânticos⁷⁹, óxidos metálicos⁸⁰ e nanopartículas metálicas⁸¹.

O sensor espectroelectroquímico proposto foi constituído por nanopartículas de ouro (AuNPs) suportadas em rGO imobilizado no *minigrid* de platina. Este material nanoestruturado teve excelente sensibilidade para a detecção do AAS, produzindo um limite de detecção baixo. Assim foi demonstrado que o *minigrid* de platina modificado com rGO/AuNPs é uma

ferramenta rápida e simples para medidas das concentrações de AAS em amostras clínicas e ambientais.

1.3.2 Interação do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico com o ferro

A possibilidade de formação de um complexo entre ácido acetilsalicílico, ou ácido salicílico e o ferro *in vitro* foi estudada através de experimentos envolvendo espectroeletrólítica com a finalidade de atribuir características que conferem estabilidade suficiente para o complexo influenciar na absorção de ferro no organismo humano.

Além dos efeitos colaterais provocados pelas características físico-químicas intrínsecas do AAS, pode ocorrer a interação com micronutrientes essenciais que provoca a redução da biodisponibilidade destes e/ou diminui a eficiência do mecanismo de ação do fármaco. Esta é uma temática relevante para o estudo do comportamento de fármacos em organismo que recebe suplementação de nutrientes. A pesquisa entre a interação de micronutrientes essenciais como o ferro e fármacos ou componentes de alimentos vêm ganhando destaque na área de pesquisa focada em suplementação alimentar⁸². Estudos *in vitro* mostram a formação de complexos entre o ferro proveniente do sulfato ferroso e componentes de alimentos, como os ácidos oxálico e fítico, taninos e polifenóis encontrados no chá mate e o antibiótico tetraciclina⁸³. Quando os componentes de alimentos ou fármacos se ligam ao Fe^{2+} ou Fe^{3+} , ocorre a competição com os prótons existentes no meio e o grau de complexação dos íons metálicos é influenciado pelos valores de pK_a do ligante e pelo pH do meio (Equações 10 e 11). Dependendo da estrutura do ligante, podem ser formados complexos com mais de um ligante por átomo de ferro⁸⁴.

Os íons hidratados $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ e $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$ são abreviados por Fe^{2+} e Fe^{3+} respectivamente. Contudo somente o íon Fe^{2+} pode existir em condições fisiológicas pois a ligação de H_2O com um íon metálico provoca o aumento da acidez e esse efeito aumenta proporcionalmente com a carga do íon metálico. O pK_a da H_2O coordenada ao Fe^{3+} é igual a 2, enquanto que para H_2O ligada ao Fe^{2+} o valor de pK_a é aproximadamente igual a 7⁸⁵. Portanto, em uma situação relevante às condições fisiológicas, onde o pH pode variar entre 5 e 9, a forma mononuclear do ferro (III) é encontrada em solução contendo os complexos $[Fe(H_2O)_4(OH)_2]^+$,

$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]$ e $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]^-$. A espécie mononuclear não carregada $\text{Fe}(\text{OH})_3$ é essencialmente insolúvel ($K_{ps} = 10^{-39}$) e em temperatura ambiente e pH 7, atinge concentrações máximas no ordem de $10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$ ⁸⁵. Uma característica comum dos cátions hidroxos aquosos é a facilidade de polimerização em complexos polinucleares com pontes hidroxílicas. As concentrações relativas destas espécies mono e polinucleares são dependentes do pH . Assim, a mudança de pH leva ao restabelecimento de um novo equilíbrio dos diferentes complexos. O equilíbrio é alcançado rapidamente e as reações envolvidas geralmente são bem caracterizadas⁸⁶. Em condições neutras, uma variedade de diferentes complexos de hidróxido de ferro polinucleares com uma ampla gama de tamanho de partícula e estrutura química podem precipitar dependendo da composição química e da temperatura da solução. Dois dos possíveis compostos que precipitam são os minerais hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e goethita ($\alpha\text{-Fe}(\text{O}(\text{OH}))$).

No organismo a forma solubilizada do hidróxido de ferro polinuclear (III) é encontrada na ferritina, sendo esta uma proteína responsável pelo armazenamento de ferro. Esta proteína é oligomérica e solúvel em água possui um núcleo $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ rodeado por 24 sub-unidades proteicas. Dois modelos diferentes foram propostos para o mecanismo de recuperação de ferro da ferritina *in vivo*. Estudos com células sugeriram que para liberar o ferro a capa proteica da ferritina é degradada por proteólise lisossômica⁸⁷.

De forma alternativa, estudos *in vitro* com a proteína purificada mostraram que a taxa de remoção de ferro da ferritina por quelantes metálicos adicionados no meio, aumenta após o desdobramento seletivo de poros localizados na ferritina. Essas mudanças conformacionais podem ser induzidas por pequenas mudanças de temperatura ou interação com componentes celulares, como a uréia, bem como por outros fatores⁸⁸. De acordo com este segundo modelo, um requisito adicional para a remoção de ferro da ferritina é a presença de um redutor, uma observação que indica que o ferro é liberado no estado ferroso⁸⁹.

Os ligantes quelantes polidentados são mais eficientes para a estabilização de espécies mononucleares, uma vez que os complexos com estes ligantes apresentam maior estabilidade termodinâmica do que os complexos correspondentes com ligantes monodentados⁸⁴. O efeito quelatante aumenta a partir de ligantes bi, tri, tetra, penta até hexa dentados. A presença de interferentes capazes de formar complexos férricos, pode em muitos casos ocasionar a anemia ferropriva, uma vez que os ligantes quelantes unem os íons de ferro de modo a não mantê-lo na forma biodisponível. A biodisponibilidade do ferro é deduzida pela taxa de liberação de íons de ferro do complexo correspondente ou de partículas coloidais no lúmen intestinal.

Nesta situação, o ácido salicílico liberado na hidrólise do AAS pode atuar como um ligante bidentado formando ligações com o ferro através dos átomos de oxigênio dos grupos

fenol e carboxila⁹⁰. A forma inalterada da molécula do AAS não possui o oxigênio do grupo fenol disponível para a ligação com o ferro e por este motivo não é relacionado à formação do complexo com o ferro⁹¹.

O corpo de um indivíduo adulto saudável e bem nutrido contém de 3 a 4 g de ferro. Da quantidade total de ferro distribuído pelo corpo humano, 60 – 70 % está contida em um compartimento funcional chamado éritron. Este é um órgão descontínuo constituído por eritroblastos, reticulócitos e hemácias. A outra parte do ferro distribuída pelo corpo está nos hepatócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE), sendo este um órgão que atua como depósito. O SRE atua catabolizando a hemoglobina na recuperação do ferro que é devolvido à transferina para uma nova utilização. O duodeno possui baixa capacidade absorptiva de ferro, apesar disso, o balanço de ferro no organismo é mantido pela absorção intestinal de forma crítica, uma vez que não existe uma via fisiológica para a excreção. A deficiência de ferro ocorre quando há desequilíbrio entre ingesta, absorção e situação de demanda aumentada (crescimento, infância e adolescência; gravidez; lactação; e tratamento com estimuladores da eritropoeses) ou anemia ferropriva (perda crônica)⁹².

A reposição de ferro via dietética pode ocorrer por diferentes fontes onde estão contido o ferro heme ou o ferro não-heme. O ferro heme (Fe^{2+}) é encontrado em produtos de origem animal, geralmente ligado a uma estrutura porfirínica da hemoglobina ou mioglobina e possui melhor absorção pelo intestino e maior biodisponibilidade. O ferro não-heme (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) é encontrado em produtos de origem vegetal na forma de sais e ao ser consumido apresenta menor biodisponibilidade. Logo, os indivíduos que consomem produtos de origem animal tem menor risco de desenvolver anemia ferropriva quando comparados com os vegetarianos⁹².

Neste sentido o trabalho propõe estudos voltados para as interações que podem ocorrer entre os íons Fe^{3+} e AAS ou AS.

1.4 Estado da arte

1.4.1 Estudos eletroquímicos do ácido acetilsalicílico e ácido salicílico

A pesquisa para a quantificação de AAS e do AS por métodos eletroanalíticos é explorada desde o início dos anos 2000. Dentre as principais motivações destaca-se; o controle de qualidade para assegurar o teor de princípio ativo em comprimidos e a poluição do solo, lençóis freáticos e bacias hidrográficas. A poluição ocorre devido ao grande consumo do fármaco pela população mundial, tendo como consequência o descarte inadequado de comprimidos fora do prazo de validade ou a eliminação de parte não metabolizada ou

metabólitos pelo organismo humano durante administração. Por estes motivos estas substâncias são classificadas como poluentes emergentes, potencialmente presentes em águas de abastecimento, devido à ineficiência dos sistemas de tratamento de efluentes.

Garrido *et al.*⁹³ quantificaram o AAS em fórmulas farmacêuticas com um detector amperométrico, por um método automatizado de injeção em fluxo de forma indireta. Neste trabalho, a corrente produzida em um eletrodo de carbono vítreo foi proporcional à concentração do íon salicilato presente em solução após a hidrólise alcalina, o que permitiu o cálculo indireto da concentração de AAS nas amostras, com um desempenho de 150 amostras por hora, sem nenhum tipo de pré-tratamento. Em outro trabalho, a hidrólise alcalina também permitiu a quantificação indireta do AAS, onde os sinais de corrente anódica corresponderam à eletrocatalise para oxidação do salicilato promovida por óxi-hidróxido de níquel presente no eletrodo de trabalho⁹⁴. Um eletrodo de carbono vítreo foi modificado com níquel eletrodepositado. O eletrodo modificado foi colocado em meio alcalino e por voltametria cíclica foi gerado o óxi-hidróxido de níquel.

O AS produzido após a hidrólise alcalina do ácido acetilsalicílico proveniente de formulações farmacêuticas, também foi quantificado por Torriero *et al.*⁹⁵ por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em eletrodo de carbono vítreo. O cálculo do número aparente de elétrons para o mecanismo de oxidação proposto foi discutido com base em funções de corrente experimentais, existentes para os compostos ferrocianeto de potássio e 1,4-hidroquinona, envolvendo 1 e 2 elétrons, respectivamente. Nesta proposta o processo global envolveu 2 elétrons, porém as mudanças das funções de corrente com o *pH* foram pequenas e sugeriram que duas transferências sucessivas de 1 elétron em cada, ocorreram em potenciais muito próximos na faixa de *pH* estudada, resultando na detecção de apenas um pico anódico durante a primeira varredura de potenciais.

Sartori *et al.*⁹⁶ utilizaram a voltametria de onda quadrada para a quantificação do AAS com eletrodo de diamante dopado com boro em meio ácido, sem a necessidade da etapa de hidrólise alcalina. A reação de oxidação ocorreu de forma irreversível em potencial de 1,97 V vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) e o método apresentou-se satisfatório para a quantificação do fármaco em diversas fórmulas farmacêuticas, com nível de confiança de 95%, quando comparado com o método oficial proposto pela farmacopeia britânica.

O emprego de nanomateriais para a modificação de eletrodos foi adotado como uma estratégia para o aumento da sensibilidade e proporcionar em alguns casos, facilidade para a transferência de carga na superfície do sensor. Com este propósito Zhang *et al.*⁹⁷ modificaram

um eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multiwall carbon nanotubes*), alinhados verticalmente na superfície para a detecção amperométrica de AS em comprimidos em meio alcalino, contendo hidróxido de sódio. O mecanismo de oxidação proposto (12) de forma empírica, levou em consideração a oxidação de uma molécula similar ao AS, a hidroquinona, que pode ser oxidada para *p*-benzoquinona. Na oxidação do AS foi suposto que o composto adsorveu na superfície dos nanotubos de carbono e então transferiu um elétron para o eletrodo formando como produto principal a carboxil-hidroquinona. No processo de eletro-oxidação ocorreu uma reação química rápida e irreversível e a carboxil-hidroquinona foi oxidada a carboxil-para-benzoquinona. Na varredura em sentido contrário a carboxil-para-benzoquinona foi reduzida a carboxil-hidroquinona e difundiu na solução. Durante a eletro-oxidação os íons OH^- também atuaram como espécies reativas e facilitaram a oxidação do AS.

A quantificação amperométrica do ácido salicílico também foi reportada por Devadas *et al.*⁹⁸ usando um sensor construído com um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanomaterial compósito de óxido de grafeno reduzido e hexacianoferrato de lutécio (LuHCF), depositado eletroquimicamente. O comportamento electrocatalítico do material foi observado pela comparação entre os potenciais de pico anódico, onde a oxidação do AS no sensor proposto ocorreu cerca de 230 mV abaixo do potencial anódico do eletrodo de carbono vítreo puro e 150 mV abaixo do eletrodo de carbono vítreo com LuHCF depositado. O mecanismo sugerido pelos autores correspondeu ao processo de eletro-oxidação apresentado em (12) sem considerar a

reação química subsequente, contudo destacou-se o efeito eletrocatalítico do LuHCF contribuindo para o melhor desempenho do sensor.

A diversidade de estratégias para a modificação de eletrodos em trabalhos realizados para a quantificação de AAS e AS, abrange também a construção de biossensores. Elahi *et al.*⁹⁹ imobilizaram o DNA com cadeia dupla extraído da glândula timo de bezerro, por meio de adsorção física em um filme constituído por nanofibras de polipirrol, eletrodepositado na superfície de um eletrodo de platina. A resposta eletroquímica do biossensor foi obtida por voltametria de pulso diferencial com base na ligação dos analitos (AAS e AS) ao resíduo de aminoácido guanina presente no DNA, onde a corrente observada diminuiu proporcionalmente com o aumento da concentração do analito em meio tamponado com *pH* 7,2.

A enzima salicilato hidroxilase foi utilizada em um biossensor para a detecção de salicilato em soro sanguíneo, com base na resposta de corrente obtida para a eletro-oxidação do catecol produzido pela conversão catalítica do salicilato (13)¹⁰⁰. Para a imobilização da enzima em um eletrodo de carbono vítreo foi adotado um procedimento de eletropolimerização em meio contendo pirrol e glutaraldeído. Adicionalmente, foi incorporado $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ao polímero formado para o efeito de mediação de elétrons e redução de resposta provenientes de possíveis interferentes.

A quantificação simultânea de AAS e cafeína em amostras de urina humana usando métodos eletroanalíticos, também foi reportada na literatura, onde foi usado voltametria de onda quadrada, com eletrodo de carbono pirolítico para a oxidação dos analitos em uma proposta de sensor relativamente barato e sem a necessidade de procedimentos de modificação⁶⁸. A modificação de um eletrodo de carbono vítreo com um filme de 4-polivinilpiridina e MWCNT também permitiu a quantificação simultânea de AAS e cafeína¹⁰¹ em formulações farmacêuticas por voltametria de pulso diferencial. Mediante inferências sobre a resposta de corrente obtida nos voltamogramas foi proposta a eletro-oxidação do AAS após a etapa de hidrólise em um mecanismo (14) onde são envolvidos 2 prótons e 2 elétrons. A detecção simultânea do AAS com outros compostos também foi realizada com um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme compósito de Nafion® e óxido de grafeno reduzido¹⁰². O sensor

proposto utilizou a voltametria de onda quadrada com *stripping* anódico adsorativo para a separação dos sinais de corrente durante a oxidação do AAS, paracetamol e cafeína.

(14)

Ainda na linha de pesquisa com detecção simultânea, o ácido salicílico foi quantificado na presença de paracetamol, tendo como sensor um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme misto de óxido de rutênio/cianeto de rutênio¹⁰³. O mecanismo de eletro-oxidação proposto (15), considera a transferência de 1 elétron para o eletrodo com a formação de um radical cátion seguida por dimerização e formação de um oligômero.

Em outro trabalho¹⁰⁴ foram obtidas repostas para a quantificação de AAS em amostras de plasma, soro, saliva e urina humana, com considerável seletividade, utilizando voltametria de pulso diferencial. O bom desempenho do sensor foi obtido pela modificação de um eletrodo de ouro com um polímero molecularmente impresso (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*) sintetizado via eletropolimerização do monômero funcional, *p*-aminotiofenol na presença do analito (molécula molde) e nanopartículas de ouro. As respostas de corrente de pico anódico para a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, permitiram a quantificação indireta do AAS, uma vez que a religação do analito na matriz polimérica provocou a inibição proporcional do sinal analítico a sua concentração no meio.

Wudarska et al.¹⁰⁵ utilizaram voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial para a investigação do processo de oxidação do AAS e sua cinética em eletrodo de platina. A constante de velocidade, coeficiente de difusão e coeficiente de transferência eletrônica foram determinados. Os mecanismos de eletro-oxidação foram propostos de acordo com a faixa de *pH* estudada, sendo que na faixa de *pH* 2 - 8, ocorre o processo de forma irreversível com a transferência de 1 elétron e 2 prótons (16); na faixa de *pH* 8 - 12,5, o processo de eletro-oxidação envolve 1 elétron (17).

Possíveis mecanismos para a eletro-redução do AAS em eletrodo de platina foram proposto na literatura¹⁰⁶ em diferentes faixas de pH . Uma proposta correspondeu a $pH < 8$ (18) e a outra a $pH > 8$ (19) em um trabalho onde também foram determinados os parâmetros cinéticos da reação por voltametria cíclica. A proposta remeteu a um processo quase-reversível que ocorreu em duas etapas de onde foram calculados constante de velocidade, coeficiente de transferência de carga e coeficiente de difusão. A primeira etapa correspondeu a hidrólise do AAS (etapa química) e a segunda etapa (eletroquímica) remeteu a transferência de 1 elétron para a molécula do produto da hidrólise gerado, salicilato para $pH > 8$ e ácido salicílico $pH < 8$.

Embora existam diversos mecanismos propostos na literatura para os processos redox do AAS e AS, a determinação do número de elétrons envolvidos em todos estes trabalhos foi realizada através de inferências sobre voltamogramas e não foram confirmadas por metodologia complementar para a caracterização dos produtos e subprodutos formados.

1.4.2 Estudos relacionados à complexação do ferro por ácido acetilsalicílico e salicílico

A pesquisa para a quantificação de ácido acetilsalicílico em amostras de fluídos biológicos e comprimidos para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas, proporcionou diversas publicações onde a interação entre íons de ferro e AAS ou AS foi abordada.

Em 1911 na primeira destas publicações, uma amostra contendo aspirina foi agitada e solubilizada em água e etanol e em seguida filtrada; então uma gota de uma solução de cloreto férrico foi adicionada e a coloração mudou de avermelhado para violeta escuro. Este foi o ponto de partida para o teste para ácido salicílico em comprimidos de aspirina existente em compêndios de métodos oficiais¹⁰⁷.

A formação do complexo entre ácido salicílico e íons Fe^{3+} foi investigada por Agren¹⁰⁸ em 1954. As constantes de formação e o coeficiente de absortividade molar do complexo foram determinados por métodos potenciométrico e fotométrico. Kelly¹⁰⁹ discutiu sobre a formação deste complexo, considerando que o ácido salicílico atua como um ligante bi-dentado resultando em uma série de quelatos com a razões ligante-íon férrico de 1:1, 2:1 e 3:1. A formação do quelato envolve a saída do hidrogênio fenólico fracamente ácido e a coordenação do metal em um anel com seis membros, através dos grupos fenolato e carboxilato do ácido salicílico (20).

n: 1, 2 ou 3

(20)

A pesquisa sobre a determinação de ácido salicílico em fluídos biológicos empregando a formação do complexo com íons férrico possui trabalhos relevantes na literatura. Um método

rápido foi proposto com esta finalidade tendo como matrizes de análise sangue e urina. A determinação foi baseada na reação dos reagentes nitrato de ferro, cloreto de mercúrio e ácido clorídrico que precipitaram as proteínas presentes na amostra e reagiram com o ácido salicílico tornando a solução de teste com coloração violeta e então a densidade óptica foi medida por um colorímetro fotoelétrico. Martens e Meyer¹¹⁰ propuseram no ano de 1995, um procedimento de análise fotométrica do ácido salicílico em soro humano para o monitoramento terapêutico da droga em pacientes com artrite reumatóide. O trabalho foi baseado na extração ácida, re-extração básica e detecção do complexo formado entre o fármaco e íons férrico.

A interferência do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico na absorção de ferro pelo organismo foi tratada em uma abordagem voltada para o efeito de alimentos e fármacos na dieta alimentar de indivíduos que usam suplementos para o tratamento de anemia⁸⁴. Estudos *in vitro* comprovaram a formação do complexo entre íons férrico e o AS, durante o monitoramento da absorbância no comprimento de onda máximo característico para o produto da reação (525 nm). Em experimentos para a identificação da formação do complexo entre os íons férrico e AAS em solução ocorreu ausência de respostas de absorbância.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que discutem a interação entre os íons de ferro e AAS ou AS com base em metodologia de análise baseada em espectroeletróquímica.

1.5 Justificativa

O uso da espectroeletróquímica permite a proposta dos mecanismos de reação para a eletro-oxidação e eletro-redução do AAS e AS de forma assertiva e alternativa às metodologias propostas na literatura onde foram feitas inferências sobre resultados obtidos por voltametria. A associação entre a perturbação eletroquímica e a variação nos espectros de absorção na região UV-vis, permite através da Lei de Faraday a proposta do número de elétrons envolvidos durante os processos estudados, onde as possíveis respostas de corrente de pico apresentadas pelo material do eletrodo são descartadas. Neste caso a carga envolvida na etapa eletroquímica é associada a variação da quantidade das espécies, monitorada por espectrofotometria.

A realização dos experimentos em soluções com diferentes valores de *pH* abrangendo as reações ácida, neutra e alcalina, permitem a elucidação sobre o comportamento das moléculas do AAS e AS nas diferentes regiões do sistema digestivo. Os resultados obtidos em diferentes regiões de *pH* são tomados como base para a proposta de metodologias analíticas para a detecção dos fármacos em matrizes biológicas e de interesse ambiental.

Os estudos espectroeletróquímicos também permitem a avaliação de possíveis interações entre AAS ou AS e o ferro presente no organismo por ingestão de alimentos. Nesse aspecto há

interesse sobre a investigação de reações de complexação com potencial diminuição da biodisponibilidade de Fe^{3+} , oriundo da ingestão de alimentos vegetais. Para essa proposta são conduzidos estudos *in vitro* simulando o ambiente ácido do estômago onde ocorre a primeira etapa da digestão dos alimentos com a probabilidade de interação entre as moléculas encontradas na formulação do fármaco AAS e AS. O grande interesse pela ocorrência de complexação do Fe^{3+} é correlacionado ao uso contínuo de AAS e AS para a prevenção distúrbios tromboembólicos em indivíduos vegetarianos.

2 OBJETIVOS

- Desenvolver procedimento espectroeletroquímico para a proposta de mecanismos de reação dos processos de eletro-oxidação e eletro-redução do ácido acetilsalicílico em soluções com diferentes valores de *pH*, correlacionados ao sistema digestivo.
- Elucidar a possibilidade de formação de complexo a partir da interação entre o fármaco AAS e seu princípio ativo (AS) e íons Fe^{3+} , com base em estudos epectroeletroquímicos *in vitro*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e métodos

As soluções aquosas foram preparadas com água purificada a partir de um sistema Nanopure Barnstead (Thermo Scientific, EUA), com resistividade $\geq 18,2 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. Os seguintes reagentes de grau analítico foram utilizados sem purificação adicional: ácido acetilsalicílico (AAS), brometo de potássio, 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) e nitrato de potássio (Sygma-Aldrich), ácido acético (AA), ácido salicílico (AS), ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio (Synth), ácido sulfúrico supra puro (Tedia), solução padrão de tricloreto de ferro (III) em ácido clorídrico 15 % (Merck).

Os experimentos de voltametria cíclica e coulometria foram realizados utilizando um potenciostato Autolab modelo PGSTAT 128N (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), Figura 10. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Avaspec 2048 (Avantes, Apeldoorn, Netherlands) Figura 11a, integrado à uma fonte de radiação UV-vis Avalight DHS (Avantes, Apeldoorn, Netherlands), Figura 11b, com lâmpadas de deutério e halogênio e suporte para cubetas, Figura 12a ou sonda UV-vis Figura 13. As conexões com o espectrofotômetro foram feitas via fibras ópticas, Figura 12b. A célula espectroeletroquímica utilizada (BASi, West Lafayette, EUA) era uma cubeta com caminho óptico de 1mm, Figura 14, contendo um arranjo de três eletrodos: uma rede de platina como eletrodo de trabalho; o sistema Ag / AgCl / KCl (3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência; e um fio de platina como eletrodo auxiliar. A representação esquemática da Figura 15 mostra o sistema para as medidas espectroeletroquímicas utilizando uma cubeta como célula eletroquímica ou empregando a sonda UV-vis, sendo que esta é posicionada verticalmente em uma célula eletroquímica convencional. O volume empregado para todos os experimentos realizados com a cubeta foi de 800 μL .

O pré-tratamento da rede de platina feito em duas etapas; primeiramente ela foi imersa em solução piranha, contendo peróxido de hidrogênio: ácido sulfúrico, 1:3 (v/v), durante 3 minutos; na sequência ela foi lavada com água purificada em abundância e submetida a um tratamento por voltametria cíclica, em solução de H₂SO₄ 0,1 M em um intervalo de potencial entre -0,2 V e 1,3 V em etapas distintas de 100 ciclos a 1,00 V s⁻¹, 50 ciclos a 0,50 V s⁻¹, 25 ciclos a 0,25 V s⁻¹ e 10 ciclos a 0,10 V s⁻¹.

As amostras para a realização de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), foram preparadas a partir de soluções dos produtos de eletrólise. As soluções contendo o analito de interesse foram evaporadas durante 12 horas em estufa com temperatura de 100 °C. Foram feitos discos de KBr, cada um com uma massa total

de 100 mg, contendo 1 mg do sólido remanescente. Estes discos foram submetidos a medições em um espectrofotômetro modelo IRAffinity (Shimadzu, Portland, EUA).

Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram feitos para a soluções contendo produto de eletrólise em um espectrômetro EMXplusTM (Bruker, Billerica, USA) na região e frequências da banda-X (9,50 a 9,81 GHz), com modulação de amplitude de 1G, modulação de frequência de 100 kHz, potência de radiofrequência de 2 mW e ganho de detector 5×10^4 .

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em temperatura aproximada de 25 °C e com o borbulhamento de N₂ em solução para as etapas de pré-tratamento da platina.

Figura 9 – Potenciostato Autolab PGSTAT 128N.

Fonte: Eco Chemie, Netherlands, Inc.

Figura 10 – Equipamentos para medidas espectrofotométricas. A) espectrofotômetro Avaspec 2048; B) fonte de radiação UV-vis Avalight DHS.

Fonte: Avantes Netherlands Inc.

Figura 11 – Acessórios para medidas espectrofotométricas. A) suporte para cubetas; B) cabo de fibra óptica usado para conectar a fonte de radiação no suporte para cubeta.

Fonte: Avantes Netherlands Inc.

Figura 12 – A) Sonda de transmissão com caminho óptico variável (0,5 a 10 mm). B) Especificações da sonda contendo materiais de revestimento e medidas nominais de cada estrutura do dispositivo

Fonte: Avantes Netherlands Inc.

Figura 13 – Célula espectroeletroquímica, perfil em corte transversal.

Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Sistema para medidas espectroeletroquímicas; a) computador; b) espectrofotômetro; c) fonte de luz; d) dispositivo para coleta de espectros; e) sonda UV-vis; f) suporte para cubeta empregada como célula espectroeletroquímica; g) potenciostato.

Fonte: Adaptado a partir de Avantes Netherlands Inc. e Eco Chemie, Netherlands, Inc.

O monitoramento dos produtos eletro-gerados também foi realizado através da técnica de voltabsorimetria derivada linear (DLVA). Nesta técnica a forma da função dA_R/dE vs E é morfológicamente similar às respostas obtidas para a voltametria cíclica¹¹¹. Essa metodologia combina a perturbação eletroquímica no eletrodo de trabalho Equação 21, com o monitoramento simultâneo da absorção espectrofotométrica da solução adjacente à superfície do eletrodo¹¹¹.

A absorbância (A_R) do produto da reação no eletrodo é monitorada e diferenciada em relação à variação linear de potencial (dA_R/dE) e apresentada como uma função do potencial de varredura. Para o processo no eletrodo dado pela equação 21, a corrente faradaica observada sob condição linear de varredura do potencial ($E = E_i - E_{vt}$) pode ser expressa pela Equação 22¹¹¹.

$$I = nFAD_0^{1/2}C_0^*v^{1/2}\epsilon^{1/2}\pi^{1/2}\chi(x) \quad (22)$$

Onde v é a velocidade de varredura, $\epsilon = nF/RT$ e a função pura $\pi^{1/2}\chi(x)$ (também conhecida como função de corrente onde $x = nF(E_{1/2} - E)/RT$) pode ser representada sob a forma da série da equação 23¹¹¹.

$$\pi^{1/2} \chi(x) = - \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^j j^{1/2} \exp(j\varepsilon \vartheta - j\varepsilon \Delta E) \quad (23)$$

$\Delta E = E_i - E_{1/2}$, E_i é o potencial inicial e $E_{1/2}$ é o potencial de meia-onda. A substituição da Equação 22 na Equação 23 e subsequente integração, resulta na carga observada sob condição linear de varredura do potencial (Equação 24)¹¹¹.

$$Q = -nFAD_0^{1/2} C_0^* v^{1/2} \varepsilon^{1/2} v^{-1/2} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^j j^{1/2} [\exp(j\varepsilon \vartheta - j\varepsilon \Delta E) - \exp(j\varepsilon \Delta E)] \quad (24)$$

A absorbância de R é relacionada com a carga que passa para a produção de R de acordo com a Equação 25⁷⁵.

$$A_R = 10^3 \varepsilon_R Q / nFA \quad (25)$$

A substituição da equação 27 na equação 28, seguida pela diferenciação em relação ao potencial do eletrodo e o rearranjo leva a forma do sinal óptico derivado na Equação 26.

$$dA_R / dE = \varepsilon_R D_0^{1/2} C_0^* v^{-1/2} \varepsilon^{1/2} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^j j^{1/2} \exp(j\varepsilon \vartheta - j\varepsilon \Delta E) \quad (26)$$

Embora a série que representa a função de corrente apresentada na Equação 22 seja matematicamente conveniente para as manipulações apresentadas acima, ela não é adequada para valores de $x > 0$, o que inclui a região analítica significativa do pico voltamétrico. Uma série alternativa para a representação da função da Equação 26 é apresentada na Equação 27, e esta série é adequada para todos os valores de x .

$$\pi^{1/2} \chi(x) = L + Mx - Nx^2 + (\pi/2)^{1/2} \sum_{k=1}^{\infty} (\gamma - x)^{1/2} - (\gamma + 2x) / \gamma^3 - (8b^2 + 12bx - 15x^2) / 8b^{7/2} \quad (27)$$

$$L = 0.380104813, M = 0.118680871, N = 0.043920560, \gamma = [(2k-1)^2 \pi^2 + x^2]^{1/2} \text{ e } b = (2k-1)\pi$$

No pico voltamétrico ($x = 1,1090$), $\pi^{1/2} \chi(x)$ é numericamente igual a 0,44629 a 25°C. A substituição deste valor na Equação 26 resulta na forma óptica análoga a equação de Randles-Sevcik dada pela equação 28¹¹¹

$$(dA_R / dE)_p = \beta n^{1/2} \varepsilon_R D_0^{1/2} C_0^* v^{-1/2} \quad (28)$$

$\beta = -0,08810 \text{ mV}^{-1/2}$, com a concentração é expressa em mol L^{-1} e a velocidade de varredura em mV s^{-1} .

A dependência da derivada do sinal óptico em relação à velocidade de varredura torna a técnica complementar à voltametria de varredura linear e à voltametria cíclica. Dependendo

da absorvidade molar das espécies monitoradas, a derivada do sinal óptico pode ser uma ferramenta analítica mais sensível do que a voltametria de varredura linear em uma dada velocidade de varredura.

3.2 Síntese do material compósito rGO/AuNPs e modificação da *minigril* de platina

Para a síntese de rGO foi necessário obter o óxido de grafeno (GO) como material de partida e realizar a redução química. O GO foi preparado pelo método de Hummers modificado¹¹². Foram misturados 10 g de grafite e 10 g de NaNO₃ em 450 mL de H₂SO₄ (98%). A mistura foi mantida sob agitação durante 30 minutos em banho de gelo e em seguida foi adicionado 60 g de KMNO₄, sob agitação vigorosa. A mistura foi mantida a 4 °C, durante 24 horas. Após este período, a mistura foi agitada vigorosamente sob aquecimento até atingir 35 °C, e então foi adicionado 450 mL de água. A temperatura do sistema foi rapidamente aumentada para 98 °C e mais 450 mL de água foi adicionado, seguido pela adição de 300 mL de H₂O₂ 30 % (v/v). A mistura foi refrigerada novamente a 4 °C durante 24 horas. Assim foi obtido uma solução contendo o GO. O material foi separado por centrifugação a 8000 rpm durante 30 minutos. Após a separação, o material foi lavado com HCl 5% (v/v) e água destilada, até o *pH* da água de lavagem atingir valor próximo de 7,0. Por fim, o GO foi liofilizado.

O material nanocompósito, rGO/AuNPs, foi preparado por dispersão de 150 mg de GO em 150 mL de água ultrapurificada durante 30 minutos em banho com ultrassom. Em seguida, 1,0 mL de HAuCl₄ ($2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi adicionado ao sistema. A mistura foi aquecida sob agitação contínua até ocorrer ebulição e então foi adicionado 750 mL de solução de citrato de sódio 1 % (m/v). Após 5 minutos em ebulição foi adicionado 100 mg de NaBH₄, contido em 5 mL de água. A mistura foi agitada sob aquecimento por 30 minutos e após este período arrefecida até atingir 25 °C. O sólido resultante foi lavado com água e etanol por 5 vezes e em seguida foi seco e mantido sob vácuo até o momento de ser usado. Para avaliar a influência das nanopartículas de ouro presentes no material, a síntese do rGO puro foi repetida de acordo com o que foi descrito, contudo sem a adição do HAuCl₄.

4 RESULTADOS

4.1 Espectrofotometria UV-visível

Para a investigação empírica de compostos orgânicos por espectrofotometria é comum realizar a observação dos espectros em soluções aquosas neutras, ácidas e alcalinas ou em soluções alcoólicas. Quando um centro ácido ou básico está presente em um cromóforo diretamente na estrutura, ou está ligado a ele (um auxocromo) é esperado a ocorrência de reações ácido-base provocando mudanças no espectro de absorção UV-visível, desde que as espécies formadas não possuam o espectro de absorção igual ao da molécula original¹¹³.

Os comportamentos do AAS e dos produtos de sua hidrólise, AS e AA, foram investigados em diferentes meios com a finalidade de verificar a influência do *pH* nas respostas de espectrofotometria UV-visível, Figuras 16-18. Todas as soluções foram preparadas com a concentração do analito de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

O AA não apresentou sinal de resposta. Para os experimentos envolvendo o AAS e o AS, a banda secundária de absorção exibiu variação significativa entre os compostos estudados, Tabela 6.

A comparação dos resultados para a caracterização das respostas do AAS e AS, pode ser baseada no princípio de que ambos os compostos possuem em comum a estrutura do ácido benzóico, onde a presença do grupo substituinte $-\text{OH}$ na posição *orto* do AS (produto de hidrólise do AAS) provoca a mudança batocrômica na banda de absorção secundária, inclusive em meio alcalino, com o substituinte assumindo a forma desprotonada $-\text{O}^-$. A mudança batocrômica é decorrente da doação de um par de elétrons do grupo $-\text{OH}$ (auxocromo) para o sistema conjugado, resultando no aumento do comprimento de onda máximo da banda secundária.

Em meio alcalino a mudança batocrômica é evidenciada na solução de AAS pela formação do íon salicilato, resultando em um espectro muito semelhante ao obtido para a solução de AS, Figura 16a e Figura 17b.

Figura 15 – Espectros de absorvância na região do UV-visível em de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 1,0$) e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de: (A) AAS, (B) AS e (C) AA.

Fonte: Autoria própria

Figura 16 – Espectros de absorvância na região do UV-visível em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH 13,0) e 5x10⁻³ mol L⁻¹ de: (A) AAS, (B) AS e (C) AA.

Fonte: Autoria própria

Figura 17 – Espectros de absorvância na região do UV-visível em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,6) e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de: (A) AAS, (B) AS e (C) AA.

Fonte: Autoria própria

Tabela 5 – Valores de comprimento de onda para bandas de absorção do AAS e AS

Solução	λ / nm (Banda primária)	λ / nm (Banda secundária)	Solvente
AAS 5×10^{-3} M	242,4	276,2	H_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹ (pH 1,0)
AS 5×10^{-3} M	244,7	302,9	
AAS 5×10^{-3} M	242,9	296,4	NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (pH 13,0)
AS 5×10^{-3} M	243,6	296,9	
AAS 5×10^{-3} M	242,4	275,0	KNO_3 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,6)
AS 5×10^{-3} M	243,6	297,0	

A banda primária do AAS e do AS é atribuída ao anel aromático contendo a função ácido carboxílico, comum a ambos compostos. A comparação entre as Figuras 16-18 e entre os dados da Tabela 6, permite a observação sobre a banda primária, que tanto para a solução contendo AAS como para o AS, apresenta o comprimento de onda máximo na mesma região do espectro. Os valores de comprimento de onda máximo muito próximos para a banda secundária em solução alcalina evidenciam a ocorrência da hidrólise do AAS gerando o íon salicilato. Os valores são atribuídos ao substituinte na posição *orto*, onde a presença de um par de elétrons isolados no oxigênio ligado diretamente ao anel aromático contribui para a deslocalização de ligações π , aumentando o efeito de ressonância na estrutura do composto e resultando em maior comprimento de onda, quando comparado com o AAS não hidrolisado em meio ácido ou em solução de KNO_3 0,1 mol L⁻¹.

Para investigar a estabilidade do AAS foram registrados espectros em diferentes soluções (H_2SO_4 0,1 mol L⁻¹, KNO_3 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,02 mol L⁻¹) em um período 8 horas para a avaliação do tempo necessário para a conservação de amostras e realização de medidas eletroquímicas e espectrofotométricas sem a interferência dos produtos da hidrólise. A estabilidade em meio alcalino foi avaliada em NaOH 0,02 mol L⁻¹, uma vez que hidrólise em NaOH 0,1 mol L⁻¹ é imediata, Figura 16a.

Na solução de KNO_3 0,1 mol L⁻¹ (pH = 6,6), foi observada a existência de um ombro com absorbância máxima em torno de 310 nm evidenciando o início da hidrólise, Figura 18a. Este resultado corrobora com as observações de Edwards¹¹⁴ que demonstrou que, no intervalo de $5,5 > \text{pH} < 9,0$, a reação de hidrólise do AAS é promovida pelo ataque da molécula de água sobre o composto na forma ionizada com velocidade de reação independente do pH. Na Figura 18b em H_2SO_4 0,1 mol L⁻¹ (pH = 1,0) o AAS permanece na forma não-ionizada e a existência do ombro em 310 nm é mais pronunciada, devido a hidrólise ácida catalisada pelos prótons presentes no meio¹¹⁴. Na solução de NaOH 0,02 mol L⁻¹ (pH = 13,0), Figura 18c, o ombro em 296 nm presente desde o início do experimento origina a banda secundária característica do íon

salicilato em uma reação entre o íon hidróxido e a forma aniônica do AAS evidenciando a ocorrência da hidrólise alcalina¹¹⁴ com velocidade maior em relação aos demais experimentos.

Figura 18 – Espectros de absorbância na região do UV-visível registrados em diferentes intervalos de tempo: (A) solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (B) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (C) NaOH $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria

O estudo sobre o comportamento do AAS em função do *pH* permitiu a suposição sobre a forma estrutural do composto de acordo com o eletrólito de suporte empregado. Se experimentos são iniciados em até 1 hora após o preparo das soluções, pode ser considerado que os resultados obtidos para os processos de oxidação ou redução referem-se ao AAS não ionizado em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ionizado em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrolisado em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, onde o íon salicilato contribui de forma majoritária para o espectro de absorvância na região UV-visível, Figuras 16a e Figura 18c.

4.2. Eletroquímica

O resultado para o pré-tratamento da rede de platina é apresentado na Figura 19. No voltamograma obtido foram identificados os picos correspondentes à região onde é formado o filme de óxido de platina, ou seja, $O_{A1} = 0,62 \text{ V}$, $O_{A2} = 0,69 \text{ V}$ e $O_{A3} = 0,81 \text{ V}$. Também foram observados os picos referentes à redução do filme de óxido, $O_{C1} = 0,46 \text{ V}$; adsorção e dessorção em subtenção de hidrogênio $H_{C1} = -0,14 \text{ V}$ e $H_{C2} = 0,00 \text{ V}$, respectivamente; e ionização do hidrogênio, $H_{A1} = -0,15 \text{ V}$, $H_{A2} = 0,01$ e $H_{A3} = -0,05$. Os dados mostram que a superfície da rede de platina apresentou resposta eletroquímica com valores de potenciais de oxidação e redução correspondentes à uma estrutura policristalina, conforme foi descrito por Angerstein-Koslowska *et al*¹¹⁵.

Figura 19 – Voltamograma após 10 ciclos para a rede de platina em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ desaerada, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria

As respostas eletroquímicas da rede de platina na presença do AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram verificadas em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na ausência de AAS em meio ácido, Figura 20a, foi observado uma região ampla de corrente anódica com início em $0,62 \text{ V}$, estendendo-se até potencial de inversão de varredura ($1,2 \text{ V}$). Este comportamento pode ser atribuído à formação do óxido de platina que teve sua formação iniciada em $O_{A1} = 0,62 \text{ V}$ no experimento de caracterização do eletrodo (Figura 19). Adicionalmente, para a varredura no sentido contrário ainda na ausência do AAS, ocorreu pico de corrente catódica supostamente relacionada à eletro-redução do óxido formado na etapa anterior, com potencial $E_{\text{pa}} = 0,40 \text{ V}$, sendo este valor muito próximo ao observado no experimento realizado para a caracterização do eletrodo ($O_{C1} = 0,46 \text{ V}$, Figura 19). Quando o AAS foi adicionado em meio ácido, ocorreu um pico largo de corrente anódica com $E_{\text{pa}} = 0,98 \text{ V}$, o qual sugeriu a eletro-oxidação do fármaco em uma situação onde as moléculas estavam eletro-adsorvidas na superfície do eletrodo de platina. Este processo ocorreu de forma competitiva com a eletro-oxidação do metal. Esta suposição pode ser reforçada pelo aparecimento do potencial de pico catódico, $E_{\text{pa}} = 0,38 \text{ V}$ com corrente de pico de menor intensidade quando comparado com o experimento sem o AAS. Esta informação indica que na

presença do AAS foi formada uma menor quantidade de óxido de platina na superfície do eletrodo, com intensidade de corrente proporcionalmente menor durante o processo de eletro-redução.

Em meio neutro, Figura 20b, não foram observados picos de corrente na ausência do AAS. Contudo se observa o aumento de corrente correspondente à evolução de oxigênio a partir de 1,10 V. Neste processo é suposto que uma pequena quantidade de óxido de platina foi formada na superfície do eletrodo. Esta observação foi baseada na resposta de corrente catódica obtida durante a varredura no sentido contrário, onde o aparecimento de um pico em $E_{pc} = 0,26$ V sugere que o óxido produzido na etapa anterior foi reduzido neste processo. Ao ser adicionado o AAS em meio neutro foi observado o aparecimento de um ombro amplo na região de 0,50 V e um pico largo de corrente anódica em $E_{pa} = 0,91$ V, sugerindo a eletro-adsorção do fármaco de forma competitiva com a formação do óxido de platina. Esta suposição também foi baseada na observação do pico de corrente catódica em $E_{pc} = 0,26$ V com maior intensidade em relação ao pico de corrente catódica observado na ausência do AAS. A informação indica que o aumento de corrente de pico catódico pode ser atribuída à eletro-dessorção do fármaco simultânea a eletro-redução do óxido de platina formado na etapa anterior a partir de 0,50 V.

Na Figura 20c a resposta é atribuída ao íon salicilato gerado no meio alcalino (conforme discutido em 4.1), onde um pico de corrente anódica ocorre em $E_{pa} = 0,72$ V em um processo irreversível.

Figura 20 – Voltamogramas para a rede de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em: a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; b) KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e c) NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura $0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria

Em regiões de potenciais abaixo de 0,00 V, o AAS não apresentou resposta eletroquímica significativa em soluções de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} e NaOH 0,1 mol L^{-1} . Contudo em solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} , Figura 21, foi observado a presença de picos de corrente em ambos os sentidos de varredura com $E_{pc} = -0,36$ V e $E_{pa} = -0,49$ V, quando o fármaco foi adicionado na solução, indicando a ocorrência de processos de redução em regiões de potencial ainda não exploradas por trabalhos publicados na literatura, conforme discutido no item 1.4.

A investigação sobre os possíveis produtos formados nos processos eletroquímicos observados foi realizada na etapa seguinte do trabalho com o auxílio da espectroscopia na região do UV-visível.

Figura 21 – Voltamogramas para a rede de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em KNO_3 0,1 mol L^{-1} , velocidade de varredura 0,02 V s^{-1} .

Fonte: Autoria própria

4.3 Espectroeletroquímica

O comportamento eletroquímico de eletrodos de platina na presença do AAS foi descrito em trabalhos recentemente publicados,^{105; 106} contudo os mecanismos propostos (equações 16-19) não têm o respaldo de resultados obtidos por técnicas complementares para a caracterização dos produtos formados. Por esta razão, o uso da espectroeletroquímica torna-se um diferencial para a análise do comportamento eletroquímico de compostos orgânicos.

A espectroeletroquímica óptica na região do UV-visível *in situ* permite a associação de informações sobre elétrons envolvidos em processos de oxidação e redução e de alterações

moleculares na superfície do eletrodo de trabalho. Estas características tornam a técnica mais promissora para a proposta de mecanismos de oxidação e redução eletroquímica de compostos orgânicos cromóforos.

A associação de respostas eletroquímicas com alterações na estrutura molecular do AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida por meio do monitoramento do espectro na região do UV-visível durante os processos de oxidação ou redução sob potencial controlado, usando a célula eletroquímica da Figura 14 em um sistema integrado como o da Figura 15f. Com a metodologia adotada foi possível avaliar a ocorrência de eletrólise do composto em regiões de potenciais onde o transporte de massa deve ser controlado pela difusão das espécies até a superfície do eletrodo de trabalho.

A coulometria sob potencial controlado é o método usual para a determinação do número de elétrons (n) envolvidos em reações na superfície do eletrodo de trabalho durante a eletrólise, sem o conhecimento prévio sobre a área do eletrodo ou coeficiente de difusão da espécie estudada. A carga envolvida no processo de eletrólise é usada para o cálculo de n através da Lei de Faraday (Equação 29), sendo Q a carga envolvida no processo, n o número de elétrons, N o número de mols e F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1})¹¹⁶. A eficiência de experimentos envolvendo eletrólise depende da relação entre a área do eletrodo e o volume de solução usada A / V . Quanto maior for a razão mais eficiente será o processo. A célula espectroeletroquímica apresenta características favoráveis à aplicação de experimentos com eletrólise, uma vez que o volume de solução usado é pequeno ($800 \mu\text{L}$) e a rede de platina fica em contato com a solução em um compartimento estreito com largura de $0,1 \text{ cm}$, caracterizando um arranjo do tipo “sanduíche” de camada fina. Neste tipo de arranjo o transporte de massa ocorre via difusão linear em processos de eletrólise com intervalos de tempo relativamente curtos¹¹⁷.

$$Q = n.F.N \quad (29)$$

A medida da variação do espectro de absorção do AAS na região do UV-visível foi realizada em soluções de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de forma simultânea à passagem de carga durante a eletrólise sob potencial controlado. Para cada caso, os valores de potenciais escolhidos pertencem à região de cada voltamograma apresentado no item 4.2, onde o transporte de massa para a superfície do eletrodo é controlado por difusão, assegurando a ocorrência de experimentos com maior eficiência de corrente.

4.3.1 Experimentos em meio ácido

A Figura 22a mostra o aumento da carga envolvida na aplicação de $E = +1,10$ V durante $t = 600$ s em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0) contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAS. O processo envolve a carga de 2,72 mC, sem alteração significativa no espectro UV-visível, apresentado na Figura 22b. Os resultados permitem a confirmação sobre a hipótese de que a carga envolvida no processo corresponde a eletro-adsorção de moléculas do AAS na superfície do eletrodo de forma competitiva com a oxidação da platina¹¹⁸. As bandas do espectro de absorção do fármaco não sofreram deslocamento e variação de intensidade durante o processo de eletrólise. Por se tratar de um composto com características análogas a um ácido benzóico substituído, qualquer mudança ocasionada na estrutura de um ou dos substituintes por eletro-oxidação ou eletro-redução, provocariam mudanças significativas nas transições eletrônicas correspondente a aromaticidade do anel e consequentemente seriam observadas alterações para a resposta das bandas de absorção da molécula produzida.

Estes resultados ao serem confrontados com a proposta de mecanismo de Wudarska et al.¹⁰⁵ (equação 16), permitem importantes observações sobre o comportamento químico e eletroquímico da molécula do AAS em meio ácido. Uma delas é relacionada à ocorrência de hidrólise da molécula em uma etapa prévia à eletro-oxidação. Apesar de ser comprovado a ocorrência da hidrólise ácida da molécula através dos resultados apresentados na Figura 16a em 4.1, esta reação não produz quantidade significativa de AS em um intervalo de tempo menor que 1 hora, tempo suficiente para o preparo da solução e realização dos experimentos. Os espectros de absorbância obtidos para o AAS, Figura 22b, mostram duas bandas de absorção características¹¹⁴ para a forma molecular do fármaco com comprimentos de onda máximo em 238 nm e 276 nm. Os dados não apresentam evidências sobre a ocorrência de hidrólise, uma vez que nesta situação a banda secundária do AAS seria deslocada para o valor de comprimento de onda máximo em torno de 300 nm, o que corresponde a forma molecular do AS supostamente gerado em solução¹¹⁴.

Figura 22 – a) Carga medida para AAS em rede de platina sob potencial controlado (+1,1 V), $t = 600$ s; b) Espectros UV-visível em função do tempo. Eletrólito H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Experimentos em meio neutro

O comportamento espectroeletroquímico do AAS em meio neutro na eletrólise em $E = +1,10$ V durante $t = 600$ s foi similar ao apresentado em meio ácido. Neste caso, a Figura 23a mostra o aumento da carga envolvida durante a eletrólise em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,6) contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAS. O processo envolveu a carga de 2,62 mC, sem alteração significativa no espectro UV-visível, apresentado na Figura 23b. Novamente foi confirmada a hipótese de que a carga envolvida no processo corresponde à eletro-adsorção de moléculas do

AAS na superfície do eletrodo de forma competitiva com a oxidação da platina, com um comportamento característico para determinados compostos orgânicos em superfície de platina¹¹⁸.

Figura 23 – a) Carga medida para AAS em *minigrid* de platina sob potencial controlado (+1,1 V), $t = 600$ s; b) Espectros UV-visível em função do tempo. Eletrólito KNO_3 0,1 mol L^{-1} .

Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos para os estudos espectroeletroquímicos do AAS em KNO_3 0,1 mol L^{-1} ($\text{pH} = 6,6$) foram publicados no formato de artigo¹¹⁹ (Apêndice A). A Figura 24a, mostra o resultado para a coulometria realizada para uma solução de AAS $2,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} sob o potencial de $E = -0,69$ V, onde foi registrada a passagem de carga total de -32,5 mC de forma simultânea à coleta dos espectros de absorvância, Figura 24b. O espectro inicial do AAS corresponde à forma ionizada da molécula, com bandas primária e secundária com absorções

máximas características em 243 nm e 275 nm¹¹⁴. As variações do espectro de absorção em função da carga envolvida na eletrólise permitiram uma análise sobre as alterações ocorridas na banda secundária, onde foi observado o deslocamento hipsocrômico com mudança do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 275 nm para 267 nm. Estas mudanças no espectro são características para fenômenos de remoção de conjugações da molécula¹⁶. Considerando que a banda primária não sofreu deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ e que esta é atribuída ao anel aromático¹⁶, as mudanças nos espectros associadas com a formação do produto da eletrólise do AAS corresponderam à remoção da conjugação existente do grupo carbonila substituinte. Além disso, a diminuição da absorbância máxima em $\lambda = 243$ nm foi associada ao consumo do AAS na forma iônica, permitindo o uso da Lei de Lambert-Beer (1) para calcular a variação da concentração do fármaco durante a eletrólise.

O coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon_{243\text{nm}} = 1520 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi obtido pela substituição dos seguintes valores em (1): valor de absorbância inicial, $A_{275\text{nm}} = 0,38$; caminho óptico da célula, $b = 0,1$ cm; e concentração inicial de AAS, $C^{\circ}_{\text{AAS}} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O valor calculado para $\epsilon_{243\text{nm}}$ está de acordo com a literatura¹²⁰.

A concentração final de AAS ($C_{\text{AAS}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi calculada substituindo os seguintes valores em (1): coeficiente de absorvidade molar, $\epsilon_{243\text{nm}} = 1520 \text{ L mol}^{-1}$; valor de absorbância final, $A_{275\text{nm}} = 0,29$; e o caminho óptico da célula $b = 0,1$ cm.

A variação da concentração ($C^{\circ}_{\text{AAS}} - C_{\text{AAS}} = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) multiplicada pelo volume de solução contido na cubeta ($V = 800 \mu\text{L}$) teve como resultado o número de mols envolvidos na eletrólise, $N = 4,8 \times 10^{-7} \text{ mol}$. A substituição de N e do módulo da carga envolvida na eletrólise (32,5 mC) na Lei de Faraday (29), resulta no número aparente de elétrons, $n = 0,7$ envolvidos na eletrólise, a aproximação deste valor equivale a $n = 1$.

Um mecanismo para a eletro-redução da forma molecular do AAS foi proposto (30), tendo como base o número de elétrons envolvidos na eletrólise e as variações na banda secundária do espectro de absorbância durante o processo eletroquímico. Nas condições em que foram realizados os experimentos, a remoção da conjugação do grupo carbonila substituinte é atribuída a um processo envolvendo 1 elétron para a formação de um ânion radical. Este tipo de mecanismo de reação com a formação de um radical localizado no grupo substituinte carbonila foi proposto por Silvester *et al.* para a eletro-redução do íon benzoato e benzoatos substituídos¹²¹.

Figura 24 – a) Carga medida para AAS no *minigrad* de platina sob potencial controlado (-0,69 V), $t = 480$ s; b) Espectros na região do UV-visível em função do tempo. Eletrólito KNO_3 0,1 mol L^{-1} .

Fonte: Adaptação de T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

A análise sobre os resultados obtidos para espectroscopia RPE para amostra obtida após a eletrólise, proporcionou importantes considerações sobre o mecanismo de reação proposto.

Não foi possível realizar a detecção direta do ânion radical formado pela eletrólise da forma iônica do AAS em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As causas para a não ocorrência de resposta para a presença de radicais nas amostras foi investigada. Na Figura 25, são apresentados espectros de absorção na região do UV-vis, obtidos: antes da eletrólise; no final da eletrólise; e em intervalos de tempo depois da eletrólise com $t = 60 \text{ s}$, 120 s e 180 s . O deslocamento da banda secundária, atribuído a forma iônica do AAS na produção do suposto ânion radical, foi regenerado após a eletrólise, sendo que o espectro observado após 180 s pode ser inferido à conversão da espécie reduzida para a forma oxidada, devido a instabilidade do radical formado. Esse fenômeno ocorre em tempo menor que o necessário para o preparo e análise dos experimentos de espectroscopia de RPE da amostra.

Para essa situação foi adotado o método de *spin trapping*, como uma estratégia para a estabilização do ânion radical formado, tornando possível a sua detecção indireta nos experimentos de RPE. Este método consiste na reação entre o radical livre de interesse e uma molécula diamagnética, aprisionando o *spin* e prolongando o tempo de vida do radical livre¹²². O composto diamagnético utilizado foi o 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 26.

O espectro RPE para o radical livre “aprisionado” pelo DMPO em uma solução obtida após a eletrólise da forma iônica do AAS é apresentado na Figura 27. Os dados indicam que o ânion radical formado em (30), transferiu seu elétron desemparelhado para o oxigênio molecular dissolvido em solução gerando o radical superóxido, este reagiu imediatamente com a água formando o radical hidroperoxil. As moléculas do DMPO “aprisionaram” o *spin* do radical hidroperoxil, que em seguida decompoe-se formando o aduto DMPO-OH (31) com a estrutura molecular apresentada na Figura 28. O aduto apresentou o espectro RPE com fator de acoplamento $a = 15,0 \text{ G}$, calculado pela distância entre as divisões hiperfinas (Figura 27). O fator de acoplamento calculado é característico para o composto e possui valor de acordo com encontrado na literatura¹²². Além do fator de acoplamento, também foi calculado o padrão

isotrópico de divisão hiperfina, definido como $2Ml + 1$, sendo M a quantidade de núcleos paramagnéticos do radical e l a rotação de cada núcleo equivalente¹⁸. Baseado na estrutura molecular do aduto formado (Figura 28), a molécula possui os núcleos paramagnéticos referentes a 1 átomo de nitrogênio que realiza duas ligações covalentes e uma ligação covalente coordenada, restando um elétron desemparelhado e 1 átomo de hidrogênio ligado do OH. Procedendo com os cálculos (32) foi considerado que os átomos de hidrogênio mencionado não são equivalentes e o número de divisões hiperfinas para o padrão isotrópico esperado foi igual a 4, valor confirmado pelo espectro apresentado na Figura 27.

$$(2M_N l_N + 1)(2M_H l_H + 1) = \left[2(1)\left(\frac{1}{2}\right) + 1 \right] \left[2(1)\left(\frac{1}{2}\right) + 1 \right] = 2.2 = 4 \quad (32)$$

Figura 25 – Espectros de absorbância na região do UV-visível coletados antes e após a coulometria. Experimento para a avaliação de estabilidade do ânion radical formado durante a eletrólise.

Fonte: autoria própria.

Figura 26 – Fórmula estrutural da molécula do DMPO.

Fonte: autoria própria.

Figura 27 – Espectro RPE para solução contendo o produto da eletrólise da forma iônica do AAS na presença de DMPO.

Fonte: Adaptação de T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112.

Figura 28 – Fórmula estrutural da molécula do [DMPO-OH]•. Em destaque átomos com núcleos paramagnéticos que influenciam na reposta do espectro RPE para o radical.

Fonte: autoria própria.

A detecção indireta do ânion radical por espectroscopia RPE corrobora com a proposta do mecanismo em (30) e permite que sejam feitas observações adicionais sobre a resposta eletroquímica apresentada no voltamograma da Figura 21. Na etapa onde é apresentada corrente de pico catódico em $E_{pc} = -0,49$ V, houve a formação do ânion radical e, nas condições experimentais adotadas, a varredura até o potencial relacionado com a corrente de pico anódico em $E_{pa} = -0,36$ V ocorreu em intervalo de tempo $t = 37,5$ s, menor que o necessário para a desestabilização total do ânion radical ($t = 180$ s). O tempo calculado para a varredura de potenciais transcorrer entre os picos de corrente catódica e anódica foi calculado com a divisão do intervalo de potencial existente entre os picos ($\Delta E = 0,75$ V) pela velocidade de varredura utilizada ($\nu = 0,02$ V s⁻¹).

Experimentos foram realizados para intervalo de varredura de potencial entre a região de potenciais de pico catódico e anódico com tempo maior que 180 s. Para isso foi calculado o valor para a velocidade de varredura satisfazer essa condição. A divisão de $\Delta E = 0,75$ V por 180 s resultou em velocidade de varredura $\nu = 0,004$ V s⁻¹. A velocidade de varredura $\nu = 0,002$ V s⁻¹ foi selecionada, considerando que para $\nu < 0,004$ V s⁻¹ o radical ânion formado na etapa de eletro-redução deveria estar desestabilizado, não apresentando resposta significativa para a oxidação. A comparação da Figura 29 com a Figura 21, confirma a hipótese de que o radical formado na etapa de eletro-redução da forma iônica do AAS é instável em intervalo de tempo $t > 180$ s após a sua formação em $E_{pc} = -0,46$ V, devido à ocorrência discreta de pico de corrente anódica em $E_{pa} = -0,39$ V (Figura 37), sendo esta resposta diferente daquela observada no voltamograma da Figura 21, onde a formação dos picos de corrente catódica e anódica com mesma intensidade foi atribuída à formação e eletro-oxidação do radical ânion antes de seu desaparecimento.

Figura 29 – Voltamogramas para a *minigrad* de platina na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura $0,002 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: autoria própria.

A existência de resposta para a eletro-redução da forma iônica no AAS em meio neutro, e a explicação do mecanismo relativo a este processo, contribui com informações importantes para a pesquisa sobre o comportamento e detecção do fármaco em amostras biológicas com pH neutro. Esta associação pode ser feita a estudos para a identificação do AAS em líquido sinovial, o qual possui como função no organismo a “lubrificação” de articulações e cartilagens, entre outras. Esse fluido possui pH em torno de 7,0 podendo ser ligeiramente diminuído no caso de inflamações¹²³. Sob este aspecto alguns trabalhos da literatura discutem os efeitos benéficos do AAS no tratamento da artrite reumatoide, relacionada à inflamação de articulações.^{124; 125} Outro fluido biológico com características que podem ser associadas à detecção do AAS em meio neutro é a urina. Esta possui valores de pH normais dentro da faixa de 4,6 - 8,0 e pH médio de 6,0¹²⁶.

4.3.2.1 Aplicação analítica sobre o comportamento espectroeletroquímico do AAS em meio neutro

Além da proposta do mecanismo de redução do AAS, o trabalho contido no Apêndice A, traz resultados sobre experimentos para a sua determinação espectroeletroquímica em amostras de comprimidos de aspirina, urina e água de córrego. A seleção das amostras partiu do pressuposto de que 40% dos fármacos ingeridos é eliminado do corpo humano em sua forma química ou como seus metabólitos, onde é atribuído o potencial de contaminação ambiental.

Considerando que o AAS é o fármaco mais consumido no mundo e as estações de tratamento de efluentes são ineficientes para a remoção deste tipo de contaminante, a alta demanda leva ao aumento da produção resultando em um grande volume de águas residuais sendo contaminado por resíduos da indústria farmacêutica^{61; 62; 63; 127; 128; 129}.

Nesta proposta o *minigrad* de platina foi modificado com o nanomaterial compósito de óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro (rGO/AuNPs). As Figuras 30 e 31 apresentam micrografias obtidas para a caracterização do material, empregando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente.

Figura 30 – Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o material híbrido rGO/AuNPs.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão: a) nanofolhas de grafeno; b) material compósito, rGO/AuNPs.

a)

b)

Fonte: Autoria própria.

A micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o material híbrido, rGO/AuNPs, foi obtida usando retroespalhamento de elétrons em uma ampliação de 250.000 vezes (Figura 30). As nanopartículas de ouro são representadas por manchas brancas brilhantes e foram distribuídas de forma homogênea na superfície das nanofolhas de rGO. Para obter mais informações sobre a estrutura do rGO e o material híbrido rGO/AuNPs, foram avaliadas as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 31). As nanofolhas de rGO e rGO/AuNPs são mostradas na Figura 31a e Figura 31b, respectivamente. Os diâmetros das partículas foram medidos diretamente das micrografias usando o software ImageJ. A partir dessas micrografias foi obtido um valor médio de $5,65 \pm 1,64$ nm, para AuNPs imobilizadas na folha de rGO. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a incorporação de AuNPs depositadas no rGO no material híbrido rGO/AuNPs em concordância com as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

O uso do rGO/AuNPs proporcionou melhor intensidade para as respostas de corrente em experimentos de voltametria cíclica, quando seus resultados foram comparados para o *minigrad* não modificado e modificado apenas com o rGO (Figura 32).

A melhor resposta apresentada pelo *minigrad* modificado com rGO/AuNPs pode ser explicada pelo fato do rGO possuir uma estrutura singular com formato de “folhas” em duas dimensões contendo átomos de carbono com orbitais sp^2 com ligações π conjugadas que promovem alta mobilidade eletrônica e transferência de carga por meio de grupos funcionais, localizados nas extremidades das folhas e atuando como portas para a transferência de carga do eletrodo para o AAS, além de evitar a formação de filmes e adsorção de gases na superfície da platina.

Assim como os grupos funcionais do rGO, as nanopartículas de ouro distribuídas pela superfície das folhas de RGO atuam como portas para a transferência de carga e aumentam a

intensidade de corrente de redução do AAS. A eficiência para a transferência de carga para a eletro-redução do AAS é maior para rGO em relação à platina e maior ainda para o rGO/AuNPs em relação ao rGO e à platina.

Figura 32 – Voltamogramas para *minigríd* de platina com e sem modificação na presença de AAS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura $0,002 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: Adaptação de T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

Para a identificação e quantificação do AAS foi adotada a técnica de voltabsorimetria derivada linear (DLVA), onde as informações espectroeletroquímicas a nível molecular foram obtidas por respostas associadas entre a variação de potenciais da voltametria linear e absorbância na região UV. Assim, o sinal é obtido pela derivada do sinal óptico (absorbância) em função do potencial (28). O monitoramento do comprimento de onda máximo e potenciais de pico de corrente específicos da molécula de interesse, confere à técnica vantagem para a aplicação direta em matrizes complexas, onde podem existir diversas espécies eletroativas além da molécula de interesse. Neste caso, a resposta um perfil análogo ao da voltametria de varredura linear. Isso permite associar a variação da absorbância máxima em comprimento de onda específico para o AAS com o pico de corrente de redução em potencial catódico também específico, ou seja, a influência de moléculas interferentes na resposta é significativamente diminuída em relação às técnicas estritamente eletroquímicas.

Os dados coletados na construção da curva de calibração para a quantificação de AAS a 275 nm são apresentados como inserção na Figura 33, onde também estão as repostas de

DLVA com os valores de $dA_{275\text{nm}}/dE$ em módulo. Esta convenção deve-se ao fato de que no processo de eletro-redução do AAS houve consumo da banda de absorção em 275 nm. Como o consumo aumenta proporcionalmente com a quantidade de AAS adicionado em solução, a variação dos valores foi expressa no sentido positivo para correlacionar o aumento da variação com o aumento da concentração do AAS.

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os cálculos foram realizados de acordo com o método estatístico descrito por Miller e Miller¹³⁰. A curva de calibração obtida é representada pela Equação 33, com coeficiente de correlação linear de Pearson, $R = 0,9992$ e limite de detecção $LD = 0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$. O LD foi calculado como 3 vezes $S_{y/x}$ dividido pela inclinação da curva de calibração. A estatística $S_{y/x}$ estima os erros aleatórios na direção y e foi calculada a partir da Equação 34. A equação usa os valores de y residual ($y_i - \hat{y}_i$), onde os valores $\hat{y}_i$ são os pontos na linha de regressão calculada que correspondem aos valores individuais de x, isto é, os valores "ajustados" de y.

$$dA_{275\text{nm}} / dE = -0,02 + 0,18[\text{AAS}](\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (33)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (34)$$

Figura 33 – Voltabsormogramas para AAS: a) ausente; b) $0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $1,23 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $1,58 \mu\text{mol L}^{-1}$; e) $1,93 \mu\text{mol L}^{-1}$; f) $2,28 \mu\text{mol L}^{-1}$; g) $2,63 \mu\text{mol L}^{-1}$; h) $2,80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, $\lambda = 275 \text{ nm}$. Inserção: regressão linear obtida para a curva de calibração.

O método apresentou bom desempenho quando realizados os testes de reprodutibilidade, pela comparação das inclinações de 3 curvas de calibração construídas, apresentando desvio padrão relativo (RSD) de 0,89 %. Também foram feitos experimentos de repetibilidade para a determinação consecutiva de 10 amostras de solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, contendo padrão de AAS $1,84 \mu\text{mol L}^{-1}$, com $\text{RDS} = 4,87 \%$. Foram realizados testes de interferentes com ácido ascórbico e ácido úrico em soluções separadas e em misturas contendo 3 vezes mais interferentes do que AAS. Nenhuma resposta foi obtida na região de potencial catódico onde ocorre a resposta do analito de interesse. A escolha dos interferentes foi baseada na provável presença destes tanto em matrizes de urina, como para água de rio.

A quantificação de AAS em amostras reais realizada para amostras de comprimidos disponíveis no mercado nacional, urina (coletada com frasco coletor universal específico para análises clínicas) e água do córrego Monjolinho, localizado na cidade de São Carlos – SP, Brasil ($\text{S}22^\circ00.725'/\text{W}047^\circ54.428'$), conforme a Figura 34. A urina analisada pertencia a um voluntário que faz uso contínuo de AAS para o controle de distúrbios tromboembólicos. A manipulação e descarte das amostras procedeu de acordo com recomendações de uso para os equipamentos de proteção individual e local de descarte¹²⁶. Todo o material não descartável utilizado nos experimentos foi lavado e esterilizado.

Figura 34 – Localização do ponto de coleta das amostras de água no córrego Monjolinho. Cidade: São Carlos – SP, Brasil.

Fonte: Adaptação de Google Maps.

Os resultados para a quantificação do AAS nas diferentes amostras foram obtidos por recuperação e são apresentados na Tabela 7. As soluções preparadas para a recuperação nas amostras dos comprimidos possuíam concentrações de $5,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, calculada com base nos valores de massa nominal do fármaco informados nas bulas. A determinação do AAS nas demais amostras reais foi feita por recuperação com solução estoque do padrão.

Os valores de porcentagem de recuperação diferentes de 100 % correspondem ao efeito de matriz, por se tratarem de amostras contendo compostos orgânicos e inorgânicos inerentes à composição. Assim, a técnica DLVA demonstrou relevância para a quantificação e identificação de AAS em matrizes complexas.

Tabela 6 – Dados para a quantificação de AAS em amostras reais.

<i>Amostra</i>	<i>Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)</i>	<i>Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)</i>	<i>Recuperado (%)</i>
A) água de córrego	-	-	-
B) água de córrego	0,88	0,83	94,32
C) água de córrego	1,05	1,00	95,24
D) água de córrego	1,93	1,82	94,30
A) comprimido	-	0,25	-
B) comprimido	0,53	0,80	150,94
C) comprimido	1,05	1,30	123,81
D) comprimido	1,23	1,58	128,46
A) urina	-	0,26	-
B) urina	1,58	2,06	130,38
C) urina	1,75	2,21	126,29
D) urina	1,93	2,25	116,58

Fonte: Adaptação de de T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

4.3.3 Experimentos em meio alcalino

Alguns resultados para os experimentos em meio alcalino permitiram a publicação de um artigo¹³¹, o qual está contido no Apêndice B. De acordo com os resultados discutidos em 4.1, o AAS hidrolisa espontaneamente em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Assim é considerado que todo o AAS adicionado foi convertido em salicilato AS⁻ com concentração igual ao do fármaco inicialmente presente nas soluções ($C = 2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹).

O potencial de +0,85 V foi selecionado a partir da resposta eletroquímica da Figura 20c, para a realização de eletrólise durante o tempo, $t = 480$ s. Nesta região de potencial foi assegurada a ocorrência da eletro-oxidação do AS⁻ e toda carga medida foi atribuída ao processo de eletro-oxidação. Na Figura 35a, o resultado para a coulometria durante a eletrólise mostra que a carga total envolvida durante todo o processo foi de +0,19 C. Na Figura 35b, os espectros de absorção obtidos de forma simultânea a eletrólise mostram a diminuição da banda em 296 nm, indicando o consumo do AS⁻. Esta variação permitiu o cálculo do número de mols envolvidos na reação.

O coeficiente de absortividade molar ($\epsilon_{296\text{ nm}} = 4015 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi obtido pela substituição dos seguintes valores em (1): valor de absorbância inicial, $A_{296\text{ nm}} = 1,00$; caminho óptico da célula, $b = 0,1$ cm; e concentração inicial de AS⁻, $C^{\circ}_{\text{AS}^{-}} = 2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ cm⁻¹. O valor calculado para $\epsilon_{296\text{ nm}}$ está de acordo com a literatura¹¹⁴.

A concentração final de AS⁻ ($C_{\text{AS}^{-}} = 9,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi calculada substituindo os seguintes valores em (1): coeficiente de absortividade molar, $\epsilon_{296\text{ nm}} = 4015 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; valor de absorbância final, $A_{296\text{ nm}} = 0,39$; e o caminho óptico da célula $b = 0,1$ cm.

A variação da concentração ($C^{\circ}_{\text{AS}^{-}} - C_{\text{AS}^{-}} = 2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) multiplicada pelo volume de solução contido na cubeta ($V = 800 \mu\text{L}$) teve como resultado o número de mols envolvidos na eletrólise, $N = 1,6 \times 10^{-6}$ mol. A substituição na Lei de Faraday (29) de N e da carga envolvida (0,19 C), resulta no número aparente de elétrons, envolvidos na eletrólise $n = 1,2$. A aproximação deste valor equivale a $n = 1$.

Figura 35 – a) Carga medida para AS^- $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em *minigrid* de platina sob potencial controlado (+0,85 V), $t = 480 \text{ s}$; b) Espectros na região do UV-visível em função do tempo. Eletrólito NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Adaptação de DO PRADO, T. M.; MACHADO, S. A. S. Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 9, p. 2569-2574, Sep 2016.

No espectro final apresentado na Figura 35b é observado o deslocamento batocrômico da banda primária de $\lambda_{\text{inicial}} = 242 \text{ nm}$ para $\lambda_{\text{final}} = 250 \text{ nm}$, além da presença de uma banda discreta em $\lambda = 393 \text{ nm}$. Estas observações indicam a presença de mais um tipo de composto formado como produto da eletrólise. A concentração relacionada ao consumo do AS^- ($C_{\text{AS}^-} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indica que cerca de 80 % do AS^- foi eletro-oxidado para a geração de um

composto majoritário responsável pelo deslocamento batocrômico em competição com outros compostos responsáveis pelo aparecimento da banda em $\lambda = 393$ nm.

Os resultados permitem a proposta de um mecanismo (35) para a formação de um composto majoritário com 1 elétron envolvido na descarboxilação do salicilato, originando radicais fenóxi. Estes radicais são estabilizados ao formarem um dímero. Esse mecanismo é característico de uma eletrólise de Kolbe¹³².

A ocorrência dos radicais fenóxi em meio alcalino e sua posterior estabilização é descrita na literatura¹³³. A apresentação da abordagem sobre o mecanismo proposto para a oxidação do íon salicilato é mais completa em relação a estudos publicados¹³⁴. No mecanismo proposto (34) o dímero formado através da formação de um radical inicialmente pela perda de 1 elétron do oxigênio do grupo ácido carboxílico é o 2,2'-bifenol.

Os possíveis subprodutos formados na reação são originados pela formação de um radical formado inicialmente pela perda de 1 elétron do oxigênio ligado diretamente ao anel aromático, em um mecanismo similar ao proposto na literatura¹³⁴ (21) para a formação de 3,6-dioxociclohexa-1,4-dienocarboxilato e 5,6-dioxociclohexa-1,3-dienocarboxilato.

Estes produtos são considerados benzoquinonas substituídas por um grupo carboxilato, onde o comprimento de onda para a absorbância máxima em $\lambda_{\text{máx}} = 393$ nm pode ser atribuído ao deslocamento batocrômico em relação ao valor esperado para benzoquinanoas¹³⁵ ($\lambda_{\text{máx}} = 389$ nm). Este feito pode ser associado à contribuição de um par de elétrons do oxigênio do grupo carboxilato para o sistema aromático. Outra evidência sobre a formação dos subprodutos foi a mudança na coloração da solução para amarelo (Figura 36), sendo que era transparente antes da eletrólise. Esse fato deve-se a extensão da banda com $\lambda_{\text{máx}} = 393$ nm até valores na região de 400 nm, onde a cor amarelo pode ser observada, de acordo com a Tabela 8.

(35)

Figura 36 – Solução amarela contida na célula espectroeletroquímica após experimento de eletrólise do AS⁻ em NaOH 0,1 mol L⁻¹. $E = +0,85$ V, $t = 480$ s.

Fonte: Autoria própria

Tabela 7 – Relação entre as cores da luz absorvidas e as cores observadas para a análise de um composto por espectrofotometria na região do visível.

Cor da luz absorvida	Comprimento de onda da luz		Cor observada
	absorvida (nm)		
Violeta	400		Amarelo
Azul	450		Laranja
Azul – Verde	500		Vermelho
Verde – Amarelo	530		Vermelho – Violeta
Amarelo	550		Violeta
Laranja – Vermelho	600		Azul – Verde
Vermelho	700		Verde

Fonte: adaptação de Zollinger, Heinrich. *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. John Wiley & Sons, 2003.

A comparação entre os espectros de absorbância coletados de forma independente para o produto formado na eletrólise e soluções padrão contendo o AS^- e bifenol (ambos $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), Figura 37, mostra que o produto formado na eletrólise possui comprimento de onda máximo idêntico para o 2,2'-bifenol na banda primária $\lambda = 250 \text{ nm}$. Em contrapartida a banda secundária do produto da eletrólise apresenta comprimento de onda máximo idêntico ao AS^- em $\lambda = 296 \text{ nm}$. Essas informações sugerem a coexistência de ambos os compostos (AS^- e 2,2'-bifenol) após a eletrólise.

A decomposição do sinal de absorbância dos espectros da Figura 37 foi feita pela derivada de segunda ordem. Este tipo de análise permite a separação dos sinais de uma mistura compostos podendo ser atribuído o comprimento de onda específico para as bandas de cada componente da mistura¹³⁶.

A Figura 38, mostra a correlação entre o sinal derivado do produto da eletrólise com os padrões de AS^- e 2,2'-bifenol. Em $\lambda = 331 \text{ nm}$ é localizado o ponto isosbético hipotético para a coexistência do AS^- com o 2,2'-bifenol. A ocorrência discreta do valor máximo de absorbância do produto da eletrólise em $\lambda = 324 \text{ nm}$ é muito mais próxima do comprimento de onda para a absorbância máxima do 2,2'-bifenol do que o valor correspondente para o AS^- em $\lambda = 335 \text{ nm}$. Estas informações corroboram com a proposta de que o 2,2'-bifenol foi obtido como produto majoritário da reação eletroquímica.

Figura 37 – Espectros de absorvância na região do UV-vis para soluções padrão de AS^- e 2,2'-bifenol ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e produto da eletrólise do AS^- .

Fonte: autoria própria.

Figura 38 – Sinais para a derivada de segunda ordem, referentes aos espectros de absorvância na região do UV-vis para soluções padrão de AS^- e 2,2'-bifenol ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e produto da eletrólise do AS^- .

Fonte: autoria própria.

Experimentos adicionais foram realizados empregando a técnica de espectrometria na região do infra-vermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier transform infrared*), Figura 39. A atribuição das bandas apresentadas pelas amostras foi feita com base nas cartas e informações de referências contidas na obra de Silverstein *et al.*¹³⁷. A análise foi feita considerando as condições da amostra antes da etapa de hidrólise alcalina, onde foram comparados os espectros do AAS e do produto da eletrólise.

No espectro obtido antes da eletrólise Figura 39a, a banda com mínimo de transmitância em 1223 cm^{-1} , correspondeu ao estiramento da ligação entre o carbono da carbonila e o oxigênio no grupo acetato do AAS, (C=O)-O. Este composto ainda apresentou a banda em 1751 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações C=O do grupo ácido carboxílico e outra banda em 920 cm^{-1} também correspondeu ao grupo ácido carboxílico, sendo esta atribuída à torções das ligações O-H fora do plano, em função de ligações de hidrogênio existentes entre as moléculas. As bandas entre $2540 - 3080\text{ cm}^{-1}$ corresponderam ao estiramento entre ligações C-H do anel aromático e para os estiramentos das ligações O-H do grupo ácido carboxílico.

No espectro referente ao produto da eletrólise, Figura 39b, a ausência da banda em 1751 cm^{-1} correspondente ao estiramento de ligações C=O do grupo ácido carboxílico, corroborou com a proposta de descarboxilação do salicilato gerado pela hidrólise do AAS em meio alcalino, assim como a atenuação das bandas na região entre $2540 - 3080\text{ cm}^{-1}$, atribuídas ao estiramento O-H do ácido carboxílico. A formação do dímero, 2,2'-bifenol, foi associada ao aparecimento de uma banda larga em 3439 cm^{-1} , atribuída aos grupos -OH substituintes de ambos anéis aromáticos da molécula. A banda discreta e larga em 650 cm^{-1} foi atribuída torções O-H fora do plano, em função de ligações de hidrogênio intermoleculares.

Figura 39 – Espectros FT-IR a) AAS; b) Produto da eletrólise do AAS em meio alcalino (2,2'-bifenol). Número de varreduras igual a 36 e resolução 4.0.

Fonte: Adaptação de DO PRADO, T. M.; MACHADO, S. A. S. Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 9, p. 2569-2574, Sep 2016.

A correlação do comportamento do AAS em meio alcalino e sua existência no organismo, pode ser feita considerando a geração dos íons salicilato durante a hidrólise alcalina do AAS na digestão do quimo. Quando este chega ao duodeno com $pH < 4,50$ e recebe o suco pancreático que possui caráter alcalino ($pH\ 8,00 - 8,30$)¹⁹. Neste sentido, a técnica espectroeletróquímica pode ser promissora no desenvolvimento e um método alternativo para a detecção de salicilato em exames toxicológicos para amostras de urina, usualmente realizados em soluções teste com pH alcalino¹³⁸.

4.4 Experimentos investigativos sobre a formação de complexos de ferro com ácido salicílico e ácido acetilsalicílico

Nos experimentos conduzidos para a avaliação da existência de tal interação foi simulado o ambiente do estômago *in vitro*. Para isso foi adotado o meio ácido de uma solução de HCl $0,1\ mol\ L^{-1}$, $pH\ 1,0$. Neste caso não foram consideradas as enzimas presentes no suco gástrico. A enzima pepsina é a principal responsável pelo início da digestão das proteínas do alimento, enquanto que o “fator intrínseco” é uma glicoproteína produzida pelas células parietais do

estômago. Tanto a pepsina como o “fator intrínseco” não interagem diretamente com o ferro no estômago. O HCl é responsável pela transformação dos íons ferroso em férrico para a posterior absorção no intestino¹³⁹.

Uma solução padrão de FeCl_3 em HCl 15% contendo 1 g de ferro foi diluída em 0,5 L de água ultrapura para obtenção da solução estoque de ferro $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. A reação para a formação do complexo foi realizada pela diluição da solução estoque de ferro para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ à uma solução contendo o ligante de interesse L (AAS ou AS) na concentração de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A mudança da cor da solução durante a reação é um indício sobre a formação do complexo $\text{Fe}(L)_n$, com n variando de 1 – 3 ligantes. Este tipo de observação não foi possível para a presença de AAS como suposto ligante. Nesta situação, a coloração da solução durante a reação permaneceu transparente, assim como era antes da mistura dos reagentes.

A teoria do campo cristalino (TCC) é utilizada para a explicação sobre a interação entre metal e ligante na formação de complexos envolvendo os orbitais d (Figura 40) dos metais de transição¹⁴⁰.

Figura 40 – Orbitais d e as respectivas distribuições de densidade eletrônica.

Fonte: autoria própria.

A configuração eletrônica do Fe^{3+} é $[\text{Ar}] 3d^5$, onde segundo a TCC, a interação entre um centro metálico e seus ligantes é puramente eletrostática. O metal isolado e em fase gasosa, possui seus orbitais d degenerados, ou seja, com a mesma energia. Quando um campo esférico com cargas negativas é colocado no entorno do centro metálico, ocorre repulsão entre os elétrons do metal e do ligante, provocando um aumento de energia nos orbitais d do metal

(desdobramento dos orbitais). Se o campo ocorrer por influência de doadores de pares eletrônicos para o metal, a simetria do campo será menor em relação a um campo esférico perfeito¹⁴⁰.

Considerando uma situação onde exista um centro metálico com os ligantes seis ligantes se aproximando; se um ligante está localizado ao longo de um dos eixos cartesianos x , y ou z ele interagirá com maior intensidade com os orbitais d (d_z^2 ou $d_z^2 - d_y^2$) que estão alinhados neste mesmo eixo e estes orbitais terão um aumento de energia; os outros orbitais que não estão localizados sobre os eixos cartesianos (d_{xy} , d_{xz} e d_{yz}), não interagirão de forma significativa com os ligantes, resultando na diminuição da repulsão eletrônica e decréscimo de energia. Os orbitais localizados sobre os eixos cartesianos são chamados de e_g e os que estão na região entre os eixos são os t_{2g} . Neste caso, a diferença de energia existente entre os dois grupos de orbitais (e_g e t_{2g}) é representada por Δ_o , onde o sub-índice “O”, neste caso, é referente a um campo cristalino octaédrico (O_h)¹⁴⁰.

Quando os ligantes interagem com os metais de transição para a formação de complexos ocorre transferência de carga. Neste caso, um dos componentes possuirá característica de doador e o outro de receptor. A coloração dos complexos com metais de transição ocorre devido a transferência de um elétron do doador a um orbital do receptor, mediante a absorção de radiação em comprimentos de onda na região do visível¹⁴⁰.

No experimento para a interação entre o Fe^{3+} e o AAS, a não absorção de radiação na região do visível (400 – 700 nm), Figura 41, evidencia que não houve formação de complexo. As bandas observadas na região do espectro UV, Figura 42, corresponde ao AAS e à mistura entre o AAS e o $FeCl_3$. Os resultados mostraram que na presença do ferro apesar de não ter ocorrido formação de complexo, o metal contribui para formação de uma banda em $\lambda = 322$ nm, além das bandas de absorção características do AAS.

A investigação sobre esse comportamento foi feita pela comparação entre os espectros de absorbância do $FeCl_3$ isolado, AAS isolado e misturas entre os dois com aumento na quantidade de AAS. Os resultados da Figura 42, revelaram que a intensidade da banda em $\lambda = 322$ nm aumentou proporcionalmente com a concentração do AAS, quando mantida a concentração do $FeCl_3$ fixa. Considerando o pK_a de 3,5 para o AAS e o pH 1,0 do meio, a molécula permaneceu protonada e a hipótese sobre a formação de um sal correspondente ao espectro resultante foi descartada. À propósito, não existem registros na literatura sobre a existência de um sal composto pelo ânion acetilsalicilato e os cátions Fe^{3+} .

Outra hipótese considera a existência de uma interação eletrostática entre o AAS e os cátions $Fe(OH_2)_6^{3+}$ em solução. Para tal situação a densidade de carga negativa no oxigênio da

carbonila do grupo ácido carboxílico do AAS orienta as moléculas ao redor dos cátions, sem a ocorrência de transferência de carga. O comportamento apresentado pelos voltamogramas da Figura 43, mostra que os valores de potenciais de pico de corrente não dependeram da presença do fármaco em solução, onde foi observado o par redox com $E_{pc} = 0,50$ V e $E_{pa} = 0,56$ V, para a solução contendo apenas o $FeCl_3$ e para a mistura com o AAS. Contudo na presença do fármaco a intensidade das correntes diminuíram. Este comportamento pode ser associado à interação íon-dipolo suposta a partir dos espectros UV-vis, onde a presença das moléculas orgânicas ao redor do metal, provocaram diminuição em seu coeficiente de difusão, restringindo certa quantidade de espécies à difundir até a superfície do eletrodo.

Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV-vis para uma solução de AAS 3×10^{-3} mol L⁻¹ e um solução contendo AAS 3×10^{-3} mol L⁻¹ e $FeCl_3$ 1×10^{-3} mol L⁻¹.

Fonte: autoria própria.

Figura 42 – Espectros de absorção na região do UV-vis para uma solução de FeCl_3 $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; AAS $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; e soluções contendo concentração fixa de FeCl_3 $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com variação na concentração de AAS ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Fonte: autoria própria.

Figura 43 – Voltamogramas para solução contendo FeCl_3 e solução contendo FeCl_3 na presença de AAS. Velocidade de varredura $0,02 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: autoria própria.

A formação de um complexo foi observada em experimento para a reação entre FeCl_3 e AS. A solução inicialmente transparente, contendo o AS, apresentou coloração violeta imediatamente após a adição da solução contendo o íon Fe^{3+} , onde metal e ligante estavam com concentrações finais de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 44).

Os espectros para absorbância na região do UV-vis de soluções contendo apenas o AS, e para o complexo formado, evidenciam a formação do complexo pelo aparecimento da banda de absorção em 515 nm (Figura 45). Na região UV, as bandas de absorção do AS apresentaram o efeito hipercrômico e um deslocamento batocrômico, revelados pelo aumento da absortividade molar de $\epsilon = 1600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para $\epsilon = 1667 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\lambda = 296 \text{ nm}$ para $\lambda = 312 \text{ nm}$, respectivamente, onde o metal que atuou como um auxocromo para as moléculas orgânicas na região do UV ao mesmo tempo em que o complexo foi formado, apresentando a banda na região do visível. Na Figura 46 é proposta a estrutura para o complexo formado onde cada uma das três moléculas do AS atuam como um ligante bi-dentado com um oxigênio fenólico e um oxigênio do grupo ácido carboxílico coordenando o metal em um campo cristalino octaédrico. As alterações observadas nos espectros na região do UV ocorrem em função da sobreposição dos orbitais s pertencentes a estes átomos de oxigênio, sobre os orbitais d do metal. No visível a banda de absorção em 515 nm corresponde à absorção de energia para as transições eletrônicas nos orbitais d do metal.

O comprimento de onda para a absorção máxima do complexo formado, permite o cálculo do número de onda $\bar{\nu} = 19417 \text{ cm}^{-1}$ atribuído à Δ_O , para a distribuição eletrônica nos orbitais d do ferro no complexo, Figura 47. O valor de Δ_O foi comparado com o valor referente ao emparelhamento de elétrons nos orbitais d do Fe^{3+} , $P = 29875 \text{ cm}^{-1}$, encontrado na literatura¹⁴¹. Assim como representado na Figura 47, para $\Delta_O < P$, o complexo apresentou campo fraco e “*spin* alto”, onde 3 elétrons foram distribuídos nos orbitais t_{2g} e 2 elétrons ocuparam os orbitais e_g , com uma configuração eletrônica $t_{2g}^3 e_g^2$. A força considerável para acomodação dos ligantes no entorno do metal pode ser explicada pela relação carga / raio do Fe^{3+} , onde quanto maior for essa relação mais estável é o complexo formado. Sendo o raio iônico do Fe^{3+} $r = 0,64 \text{ \AA}$ e a relação $Q / r = 4,69$. Além disso a distribuição eletrônica no Fe^{3+} colabora para melhor acomodação de ligantes, sendo que os sistemas d^0 , d^3 e d^5 com “alto-*spin*” não sofrem distorções tetragonais para a minimização de energia, explicadas pelo efeito Jahn-Teller¹⁴⁰.

Figura 44 – Soluções antes e depois da formação do complexo: à esquerda solução de AS, antes da reação; à direita solução contendo o complexo formado pela reação do AS com FeCl_3 .

Fonte: autoria própria.

Figura 45 – Espectros de absorvância na região do UV-vis para solução de AS, antes da reação; solução contendo o complexo formado pela reação do AS com FeCl_3 .

Fonte: autoria própria.

Figura 46 – Estrutura molecular para o complexo formado entre o AS e Fe^{3+} .

Fonte: autoria própria.

Figura 47 – Distribuição eletrônica dos elétrons do Fe^{3+} nos orbitais com desdobramento de energia.

Fonte: autoria própria.

Os voltamogramas da Figura 48, mostram a existência de dois potenciais de pico catódico, $E_{pc} = 0,50 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,27 \text{ V}$, correspondentes à eletro-redução do Fe^{3+} livre em solução e do $[\text{Fe}(\text{AS})_3]^{3+}$, respectivamente. A presença do pico anódico em $E_{pa} = 0,56 \text{ V}$ é relacionada à eletro-oxidação do Fe^{2+} gerado a partir do íon ferroso livre em solução durante a varredura catódica.

À medida que a concentração de AS aumentou, a maior quantidade de complexo formado provocou o aumento dessas espécies reduzidas na superfície do eletrodo, sendo isso evidenciado pelo aumento da corrente em $E_{pc} = 0,27 \text{ V}$. Isso também provocou a diminuição dos íons férrico livres em solução, sendo necessário um maior sobrepotencial para a eletro-redução destes, resultando no decréscimo da corrente de pico catódico e deslocamento do potencial de $E_{pc} = 0,50 \text{ V}$ para $E_{pc} = 0,45 \text{ V}$. A forma reduzida do complexo não sofreu oxidação

e o pico anódico em $E_{pa} = 0,56$ V diminui proporcionalmente à quantidade de íons ferroso gerados em solução no processo de eletro-oxidação.

Essas observações permitem a inferência sobre a estabilidade da forma reduzida do complexo em solução, onde não foi observado sua eletro-oxidação. Além disso, espectros de absorbância obtidos *in situ* após as varreduras de potencial, mostraram a ocorrência da banda de absorção do complexo proporcional à concentração reduzida em solução em solução com comprimento de onda máximo $\lambda = 525$ nm (Figura 49). Este comprimento de onda corresponde a um valor de $\bar{\nu} = 19048$ cm⁻¹, o qual é menor para P referente ao emparelhamento dos elétrons 6 do Fe²⁺ nos 3 orbitais t_{2g} , e o campo cristalino é fraco com “alto-*spin*”. Estas informações revelam que neste tipo de complexo gerado na eletro-redução, ocorre a distorção tetraédrica (efeito Jahn-Teller) típica para complexos octaédricos com sistemas eletrônicos d^6 com “alto-*spin*”¹⁴⁰.

Assumindo que o Fe²⁺ eletro-reduzido do complexo inicial foi mantido coordenado, a diferença de energia entre a eletro-redução dos íons férrico livre em solução e a eletro-redução do complexo, foi empregada para o cálculo da constante de formação do complexo, K , pelas relações (36) a (39). Onde: ΔG é a variação de energia livre de Gibbs; R , a constante dos gases ideais (8,31 J.mol⁻¹ K⁻¹); T , a temperatura em Kelvin (298 K); n , o número de elétrons ($n = 1$); e ΔE° , a variação de potencial para a presença de Fe³⁺ em solução na concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹ a 25 °C, calculada pela diferença entre o pico de potencial catódico do íon livre e do metal no complexo.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (36)$$

$$\Delta G = -nF\Delta E^\circ \quad (37)$$

$$RT \ln K = nF\Delta E^\circ \quad (38)$$

$$K = \exp \frac{nF\Delta E^\circ}{RT} \quad (39)$$

O valor da constante $K = 9,0 \times 10^{-4}$ está de acordo com o obtido por Agren¹⁰⁸ e refere à coordenação do Fe³⁺ por 3 moléculas do AS, de acordo com o mecanismo proposto em (40).

A estabilidade dos complexos foi discutida previamente, acerca da relação da carga pelo raio do átomo central, sendo que com o aumento da carga e a diminuição do raio a estabilidade aumenta. A labilidade diminui com o aumento da carga e a diminuição do raio do átomo central dos complexos. No caso do complexo formado $Q / r = 4,69$, o valor é considerado alto suficiente para conferir estabilidade aos complexos de ferro (III), ao mesmo tempo que estes apresentam labilidade, sendo esta uma característica para os complexos octaédricos dos elementos do primeiro período de transição. A labilidade é relacionada com o equilíbrio estabelecido de forma muito rápida entre os complexos e as moléculas dos ligantes, quando estas são colocadas em solução, ou até mesmo com moléculas do próprio solvente quando este funciona como ligante¹⁴¹. O valor pequeno para a constante de formação do complexo entre Fe^{3+} e AS, revela tal labilidade e a facilidade de coordenação do Fe^{3+} pelas moléculas de AS. A mudança na coloração da solução que ocorre imediatamente após a mistura entre metal e ligante evidencia tal comportamento.

Figura 48 – Voltamogramas para solução contendo $FeCl_3$ e soluções de $FeCl_3$ com sucessivas adições de AS. Velocidade de varredura $0,02 \text{ V s}^{-1}$.

Fonte: autoria própria.

Figura 49 – Espectros de absorvância na região do visível para a forma reduzida do complexo em solução.

Fonte: autoria própria.

Experimentos adicionais para a caracterização do complexo foram feitos empregando a técnica espectrometria FT-IR, Figura 50. A atribuição das bandas apresentadas pelas amostras foi feita com base nas cartas e informações de referências contidas na obra de Silverstein *et al.*¹³⁷. A análise foi feita por comparação entre uma amostra do complexo com uma amostra do ligante (AS).

A identificação dos grupos funcionais na amostra do ligante (AS) foi feita pelas bandas em: 1657 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações C=O do grupo ácido carboxílico; 893 cm^{-1} , atribuída às torções das ligações O-H do grupo ácido carboxílico fora do plano, em função de ligações de hidrogênio existentes entre as moléculas; 1444 cm^{-1} , atribuída à deformação C-O-H do ácido carboxílico fora do plano; $2538 - 3238\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento entre ligações C-H do anel aromático e O-H do grupo ácido carboxílico; 1250 cm^{-1} , atribuída às vibrações de estiramento axial do grupo -O-H fenólico.

O espectro do complexo formado mostra que os modos vibracionais identificados para o ligante foram atenuados e em alguns casos extintos, devido à coordenação das moléculas ao metal. A banda intensa e larga em 3402 cm^{-1} é atribuída à coordenação dos átomos de oxigênio do ligante no metal, onde para cada molécula foram envolvidos um oxigênio fenólico e um oxigênio da carbonila do ácido caboxílico. O desaparecimento das bandas entre $2538 - 3238$

cm^{-1} , 1657 cm^{-1} e 893 cm^{-1} , assim como a diminuição em 1444 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , são associados à coordenação do metal proposta pela estrutura da Figura 46.

Figura 50 – Espectros de transmitância FT-IR para o ácido salicílico e complexo formado.

Fonte: autoria própria.

O estudo espectroeletróquímico *in vitro* demonstrou a existência do complexo entre o AS e os íons Fe^{3+} em um ambiente similar ao do estômago. A redução do metal no complexo sem a destruição da estrutura coordenada, revela que é possível a coexistência do complexo nas formas reduzida e oxidada. No entanto, a forma reduzida do complexo apresenta distorção tetragonal provocada pelo efeito Jahn-Teller, sendo mais susceptível à desestabilização por fatores externos à “esfera de coordenação”.

Considerando as possíveis interações do AS proveniente de um comprimido de AAS e o ferro contido em alimentos, uma situação provável para que ocorra a formação de complexo seria a coordenação das moléculas de AS com íons Fe^{3+} provenientes de alimentos de origem vegetal e cereais. O que corrobora com o fato de vegetarianos serem mais propensos à anemia.

O ferro proveniente de alimentos de origem animal é biodisponível na forma heme (Fe^{2+} ligado em uma estrutura protoporfirina), após a digestão da hemoglobina e mioglobina e não está propenso à complexação com o AS. O estudo sobre a estabilidade do complexo durante o processo de absorção no intestino depende da compreensão sobre o comportamento do enterócito e as proteínas envolvidas em uma célula intestinal, Figura 51.

A redutase do *citocromo b* duodenal (Dcytb) é responsável pela redução do Fe^{3+} de alimentos de origem vegetal para Fe^{2+} que é transportado pela DMT-1, sendo esta composta por 12 segmentos transmembrana. A proteína transportadora do heme-1 (HCP1), posicionada na membrana apical das células do duodeno, é responsável pela internalização do ferro heme da dieta. O grupo heme é ligado na membrana em forma de escova, localizada na borda dos enterócitos duodenais. Neste local a HCP1 interage e atravessa a membrana plasmática, carregando o grupo heme extracelular. Em seguida o grupo heme liga-se à membrana de vesículas no citoplasma da célula. No interior da célula, o ferro é liberado da protoporfirina pela hemoxygenase. Após a liberação do ferro, este se junta à porção de ferro não heme sendo estocado na forma de ferritina ou liberado para o sangue pelo enterócito. A proteína da hemocromatose (HFE) trabalha para a regulação da absorção intestinal do ferro, interagindo com o receptor da transferrina (TfR) e detectando o seu grau de saturação. Dessa forma a HFE sinaliza para o enterócito se há maior ou menor necessidade de absorção do ferro no intestino¹⁴².

Figura 51 – Célula intestinal e proteínas envolvidas no processo de absorção do ferro.

Fonte: Adaptação de GROTTTO, H. Z. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2008.

Mediante a compreensão do mecanismo de absorção do Fe^{3+} , a real proposta de interferência provocada pelo complexo com o AS depende do reconhecimento deste pela enzima Dcytb. Esta situação não foi tratada no presente estudo, contudo é inferido que a

existência dos ligantes ao redor do metal podem diminuir a especificidade dos sítios ativos da enzima e provocar a diminuição de sua absorção no intestino. Esta suposição é relevante aos indivíduos vegetarianos, podendo ocorrer o risco de anemias pelo uso prolongado de comprimidos contendo o AS.

5 CONCLUSÃO

A investigação sobre os processos de eletro-oxidação e eletro-redução do AAS e do AS por métodos espectroeletroquímicos em diferentes regiões de *pH* permitiram a proposta dos respectivos mecanismos de eletro-reação de forma alternativa e inédita aos trabalhos encontrados na literatura.

Em meio ácido conclui-se que a forma molecular do AAS possui estabilidade suficiente para não ser influenciada pelas perturbações eletroquímicas sob potencial controlado, fato comprovado pela inalteração do espectro de absorbância da molécula na região UV-vis durante experimentos de eletrólise.

Os experimentos em meio neutro permitiram a proposta de um mecanismo para a eletro-redução da forma iônica do AAS, com o envolvimento de 1 elétron para a formação do ânion radical acetilsalicilato. A formação de radicais em solução foi comprovada pela técnica de espectroscopia RPE, onde foi constatada a influência do oxigênio dissolvido no meio de reação para a desestabilização do radical em um intervalo de tempo aproximado de 180 s e a formação do superóxido. A eletro-redução com alteração do espectro de absorbância da forma iônica do AAS, permitiu o desenvolvimento de uma metodologia para a detecção do fármaco em amostras de comprimidos, urina e água de córrego, onde a variação da concentração nas amostras foi monitorada pelo pico de $dA_{275\text{ nm}} / dE$ em função do potencial de eletro-redução na técnica de voltabsorimetria derivada linear (DLVA) com limite de detecção de $0,26\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

Em meio alcalino foi comprovado a existência de hidrólise imediata do AAS gerando os íons salicilato (AS^-) e acetato no meio. A variação do espectro de absorbância do AS^- sob potencial controlado permitiu o cálculo do número de elétrons envolvidos na reação de eletro-oxidação, onde foi proposto um mecanismo com a formação de um produto majoritário (2,2'-bifenol). Onde análises do espectro de transmitância FT-IR do produto da reação comprovaram a predominância de suas características na solução após o processo de oxidação.

Os experimentos *in vitro* simulando o ambiente do estômago, demonstraram que a formação de um complexo entre o AAS e íons de ferro não ocorre com facilidade e existe uma interação eletrostática fraca entre as moléculas do fármaco e os íons metálicos. Em contrapartida, os

experimentos para a proposta sobre a interação dos íons de ferro com o AS, mostraram que nas condições adotadas há formação de um complexo estável e lábil ($K = 9,0 \times 10^{-4}$) onde é provável o sequestro de íons Fe^{3+} pelo fármaco. Considerando a ingestão exclusiva do metal oriundo de fontes vegetais, existe a probabilidade do uso contínuo de comprimidos que liberam AS no estômago potencializar quadros de anemia em vegetarianos. A total elucidação desta teoria é tomada como uma perspectiva futura para a linha de pesquisa implementada no Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos e depende dos estudos de interação entre o complexo formado e a enzima Dcytb.

Conclui-se de forma geral que o uso da espectroeletroquímica permitiu adquirir informações em nível molecular sobre fenômenos químicos e eletroquímicos relacionados ao comportamento do AAS e do AS em regiões de *pH* ácido, alcalino e neutro, bem como a interação dos fármacos com o ferro, sendo feita a analogia dos meios de estudo às diferentes regiões do organismo humano.

Em relação ao aspecto transformador deste trabalho, conclui-se que durante os anos investidos para pesquisa em nível de doutorado foi possível ampliar o campo de conhecimento sobre diferentes áreas da química, compreendendo: físico-química, química analítica, química orgânica e química inorgânica.

REFERÊNCIAS

- ¹ BARD, A.; FAULKNER, L. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: John Wiley, 2001. 833 p.
- ² SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods**. Greifswald: Springer, 2010. 347 p.
- ³ MONK, P. M. **Fundamentals of electro-analytical chemistry**. New York: John Wiley, 2008. 361 p.
- ⁴ KUWANA, T.; DARLINGTON, R. K.; LEEDY, D. W. Electrochemical studies using conducting glass indicator electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2023-2025, 1964.
- ⁵ PONS, B. S.; MATTSON, J. S.; WINSTROM, L. O.; MARK, H. B. Application of deposited thin metal films as optically transparent electrodes for internal reflection spectrometric observation of electrode solution interfaces. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 685-688, 1967.
- ⁶ HEINEMAN, W. R.; BURNETT, J. N.; MURRAY, R. W. Optically transparent thin-layer electrodes: ninhydrin reduction in an infrared transparent cell. **Analytical Chemistry**, v. 40, n. 13, p. 1974-1978, 1968.
- ⁷ YILDIZ, A.; KISSINGER, P. T.; REILLEY, C. N. Evaluation of an improved thin-layer electrode. **Analytical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1018-1024, 1968.
- ⁸ MURRAY, R. W.; HEINEMAN, W. R.; O'DOM, G. W. An optically transparent thin layer electrochemical cell. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 13, p. 1666-1668, 1967.
- ⁹ KUWANA, T.; HEINEMAN, W. R. Study of electrogenerated reactants using optically transparent electrodes. **Accounts of Chemical Research**, v. 9, n. 7, p. 241-248, 1976.
- ¹⁰ JIAO, K.; YANG, T.; WANG, Z. J. Thin-layer spectroelectrochemistry of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine on Pt minigrid optically transparent electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 16, n. 5, p. 655-658, 2005.
- ¹¹ JIAO, K.; REN, L. Q.; YANG, T. Fabrication and evaluation of an optically transparent thin layer platinum minigrid electrochemical cell. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1299-1302, 2001.
- ¹² HUANG, Z. X.; FENG, M.; WANG, Y. H.; CUI, J.; ZOU, D. S. The direct electrochemistry of cytochrome c in the presence of various amino acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 416, n. 1-2, p. 31-40, 1996.

- ¹³ DONG, S. J.; SONG, S. H. Direct electron-transfer reaction of hemeproteins promoted by methylene-blue modified electrode. **Acta Chimica Sinica**, v. 49, n. 5, p. 493-497, 1991.
- ¹⁴ KUWANA, T.; WINOGRAD, N.; BARD, A. **Electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1974. p.1
- ¹⁵ HEINEMAN, W. R.; NORRIS, B. J.; GOELZ, J. F. Measurement of enzyme E'values by optically transparent thin layer electrochemical cells. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 79-84, 1975.
- ¹⁶ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. Brooks: Thomson Learning, 2001. 579 p.
- ¹⁷ GERSON, F.; HUBER, W. **Electron spin resonance spectroscopy of organic radicals**. New York: John Wiley, 2006. 479 p.
- ¹⁸ SCHWEIGER, A.; JESCHKE, G. **Principles of pulse electron paramagnetic resonance**. Oxford: Oxford University Press on Demand, 2001. 578 p.
- ¹⁹ TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. São Paulo: Artmed Editora, 2016. 704 p.
- ²⁰ BANNWARTH, B. Prescription of non steroidal anti-inflammatory drugs. **Bulletin De L Academie Nationale De Medecine**, v. 182, n. 7, p. 1431-1438, 1998.
- ²¹ BAE, S. C.; CORZILLIUS, M.; KUNTZ, K. M.; LIANG, M. H. Cost-effectiveness of low dose corticosteroids versus non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 specific inhibitors in the long-term treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 46-53, 2003.
- ²² CUNDIFF, D. K.; MANYEMBA, J.; PEZZULLO, J. C. Anticoagulants versus non-steroidal anti-inflammatories or placebo for treatment of venous thromboembolism. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, p. 1-31, 2006.
- ²³ HEIM, H. K.; BROICH, K. Selective COX-2 inhibitors and risk of thromboembolic events regulatory aspects. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 96, n. 4, p. 423-432, 2006.
- ²⁴ STITHAM, J.; VANICHAKARN, P.; YING, L.; HWA, J. Cardiovascular pharmacogenetics of anti-thrombotic agents and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Current Molecular Medicine**, v. 14, n. 7, p. 909-931, 2014.
- ²⁵ COLE, G. M.; FRAUTSCHY, S. A. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of alzheimer's disease. **Cns & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 140-148, 2010.

- ²⁶ HOOZEMANS, J. J. M.; VEERHUIS, R.; ROZEMULLER, A. J. M.; EIKELENBOOM, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 6, p. 461-468, 2003.
- ²⁷ HULL, M.; LIEB, K.; FIEBICH, B. L. Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 4, p. 671-683, 2000.
- ²⁸ IMBIMBO, B. P. An update on the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 8, p. 1147-1168, 2009.
- ²⁹ TSARTSALIS, S.; PANAGOPOULOS, P. K.; MIRONIDOU-TZOUVELEKI, M. Non-cholinergic pharmacotherapy approaches to alzheimer's disease: the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Cns & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 10, n. 1, p. 133-139, 2011.
- ³⁰ SCHMID, H. P.; ENGELER, D. S.; THEILER, R. Anti-inflammatory drugs and prostatic carcinoma: current state of evidence. **Aktuelle Urologie**, v. 43, n. 2, p. 112-114, 2012.
- ³¹ MAHMUD, S. M.; TANGUAY, S.; BEGIN, L. R.; FRANCO, E. L.; APRIKIAN, A. G. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and prostate cancer in a high-risk population. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 2, p. 158-164, 2006.
- ³² CLOUSER, M. C.; ROE, D. J.; FOOTE, J. A.; HARRIS, R. B. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on non-melanoma skin cancer incidence in the SKICAP-AK trial. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 18, n. 4, p. 276-283, 2009.
- ³³ SANZ-MOTILVA, V.; MARTORELL-CALATAYUD, A.; NAGORE, E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3966-3978, 2012.
- ³⁴ COLLET, J. P.; SHARPE, C.; BELZILE, E.; BOIVIN, J. F.; HANLEY, J.; ABENHAIM, L. Colorectal cancer prevention by non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timing. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 1, p. 62-68, 1999.
- ³⁵ HULL, M. A.; GARDNER, S. H.; HAWCROFT, G. Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 4, p. 309-320, 2003.
- ³⁶ ROY, H. K.; KAROLSKI, W. J.; RATASHAK, A. Distal bowel selectivity in the chemoprevention of experimental colon carcinogenesis by the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. **International Journal of Cancer**, v. 92, n. 4, p. 609-615, 2001.
- ³⁷ OTA, S.; BAMBA, H.; KATO, A. Colorectal cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 21, n. 5, p. 391-395, 2000.

- ³⁸ SHADMAN, M.; NEWCOMB, P. A.; HAMPTON, J. M.; WERNLI, K.; TRENTAM-DIETZ, A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and statins in relation to colorectal cancer risk. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 19, p. 2336-2339, 2009.
- ³⁹ HUNTJENS, D. R. H.; SPALDING, D. J. M.; DANHOF, M.; PASQUA, O. E. D. Differences in the sensitivity of behavioural measures of pain to the selectivity of cyclo-oxygenase inhibitors. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 5, p. 448-457, 2009.
- ⁴⁰ BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: A reappraisal. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 6, p. 437-450, 2001.
- ⁴¹ VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.
- ⁴² YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K. I.; KAUFMANN, W. E.; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons - regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, v. 11, n. 2, p. 371-386, 1993.
- ⁴³ TRAUTMAN, M. S.; EDWIN, S. S.; COLLMER, D.; DUDLEY, D. J.; SIMMONS, D.; MITCHELL, M. D. Prostaglandin H synthase-2 in human gestational tissues: Regulation in amnion. **Placenta**, v. 17, n. 4, p. 239-245, 1996.
- ⁴⁴ CHAKRABORTY, I.; DAS, S. K.; WANG, J.; DEY, S. K. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 2, p. 107-122, 1996.
- ⁴⁵ AKARASERENONT, P.; MITCHELL, J. A.; APPLETON, I.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase by endotoxin in cultured-cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 4, p. 1522-1528, 1994.
- ⁴⁶ ARIASNEGRETE, S.; KELLER, K.; CHADEE, K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2, messenger-rna expression in human macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 208, n. 2, p. 582-589, 1995.
- ⁴⁷ THIVIERGE, M.; ROLAPLESZCZYNSKI, M. Up-regulation of inducible cyclooxygenase gene-expression by platelet-activating-factor in activated rat alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 12, p. 6593-6599, 1995.
- ⁴⁸ TORDJMAN, C.; COGE, F.; ANDRE, N.; RIQUE, H.; SPEDDING, M.; BONNET, J. Characterization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in mouse resident peritoneal-macrophages in-vitro - interactions of non steroidal antiinflammatory drugs with COX-2. **Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1256, n. 2, p. 249-256, 1995.

- ⁴⁹ DEBRUMFERNANDES, A. J.; LAPORTE, S.; HEROUX, M.; LORA, M.; PATRY, C.; MENARD, H. A.; DUMAIS, R.; LEDUC, R. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 198, n. 3, p. 955-960, 1994.
- ⁵⁰ SZCZEPANSKI, A.; MOATTER, T.; CARLEY, W. W.; GERRITSEN, M. E. Induction of cyclooxygenase-ii in human synovial microvessel endothelial-cells by interleukin-1 - inhibition by glucocorticoids. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, n. 4, p. 495-503, 1994.
- ⁵¹ NUSING, R.; ULLRICH, V. Regulation of cyclooxygenase and thromboxane synthase in human monocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 1, p. 131-136, 1992.
- ⁵² ENDO, T.; OGUSHI, F.; SONE, S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 6, p. 2240-2246, 1996.
- ⁵³ HAWKEY, C. J. COX-2 inhibitors. **The Lancet**, v. 353, n. 9149, p. 307-314, 1999.
- ⁵⁴ VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104, n. 3a, p. 2S-8S, 1998.
- ⁵⁵ VAN RYN, J.; PAIRET, M. Clinical experience with cyclooxygenase-2 inhibitors. **Inflammation Research**, v. 48, n. 5, p. 247-54, 1999.
- ⁵⁶ GERBER, M.; BREYTENBACH, J. C.; HADGRAFT, J.; PLESSIS, J. Synthesis and transdermal properties of acetylsalicylic acid and selected esters. **International Journal of Pharmaceutics**, 31-36 p. 2006.
- ⁵⁷ TANASESCU, S.; LKVESQUE, H.; THUILLEZ, C. Pharmacologic de l'aspirine. **La Revue de Médecine Interne** v. 1, n. 21, p. 18-26, 2000.
- ⁵⁸ GERBER, M.; BREYTENBACH, J. C.; HADGRAFT, J.; DU PLESSIS, J. Synthesis and transdermal properties of acetylsalicylic acid and selected esters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1, p. 31-36, 2006.
- ⁵⁹ SANGHAVI, B. J.; SRIVASTAVA, A. K. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8638-8648, 2010.
- ⁶⁰ WANG, Y.; XU, P.-P.; LI, X.-X.; NIE, K.; TUO, M.-F.; KONG, B.; CHEN, J. Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber-optic dissolution system. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 386-389, 2012.

⁶¹ RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; FERRO-GARCÍA, M. Á.; PRADOS-JOYA, G.; OCAMPO-PÉREZ, R. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1268-1287, 2013.

⁶² STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.-D.; SILVANA VIANNA, R.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 135-141, 1999.

⁶³ ZIYLAN, A.; INCE, N. H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1, p. 24-36, 2011.

⁶⁴ MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; RIBERA, A.; CORONADO, E.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2276-2283, 2011.

⁶⁵ ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5, p. 939-947, 2001.

⁶⁶ PAYÁN, M. R.; LÓPEZ, M. A. B.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; MOCHÓN, M. C.; ARIZA, J. L. G. Application of hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewaters. **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 854-858, 2010.

⁶⁷ XU, X.-Y.; YAN, B. Selective detection and controlled release of Aspirin over fluorescent amino-functionalized metal-organic framework in aqueous solution. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 230, n. Supplement C, p. 463-469, 2016.

⁶⁸ GOYAL, R. N.; BISHNOI, S.; AGRAWAL, B. Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 2, p. 97-102, 2011.

⁶⁹ PURUSHOTHAM, M.; GUPTA, P.; GOYAL, R. N. Graphene modified glassy carbon sensor for the determination of aspirin metabolites in human biological samples. **Talanta**, v. 143, n. Supplement C, p. 328-334, 2015.

⁷⁰ BURNETT, T.; KATIAL, R.; ALAM, R. Mechanisms of aspirin desensitization. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 223-236, 2013.

⁷¹ FLOYD, C. N.; FERRO, A. Mechanisms of aspirin resistance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 1, p. 69-78, 2014.

⁷² CHAN, J. F. W.; CHOI, G. K. Y.; YIP, C. C. Y.; CHENG, V. C. C.; YUEN, K.-Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507-524, 2016.

⁷³ CHAWLA, P.; YADAV, A.; CHAWLA, V. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 169-178, 2014.

⁷⁴ ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, n. Supplement C, p. 59-68, 2015.

⁷⁵ BANCROFT, E. E.; SIDWELL, J. S.; BLOUNT, H. N. Derivative linear sweep and derivative cyclic voltabsorptometry. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 1390-1394, 1981.

⁷⁶ PARLAK, O.; TIWARI, A.; TURNER, A. P. F.; TIWARI, A. Template-directed hierarchical self-assembly of graphene based hybrid structure for electrochemical biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, n. Supplement C, p. 53-62, 2013.

⁷⁷ YARDIM, Y.; VANDEPUT, M.; ÇELİB, M.; SENTÜRK, Z.; KAUFMAN, J. M. A reduced graphene oxide-based electrochemical dna biosensor for the detection of interaction between cisplatin and dna based on guanine and adenine oxidation signals. **Electroanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1451-1458, 2017.

⁷⁸ CHEN, Q.; YU, C.; GAO, R.; GAO, L.; LI, Q.; YUAN, G.; HE, J. A novel electrochemical immunosensor based on the rGO-TEPA-PTC-NH₂ and AuPt modified C₆₀ bimetallic nanoclusters for the detection of Vangl1, a potential biomarker for dysontogenesis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, n. Supplement C, p. 364-370, 2016.

⁷⁹ WEI, Y.; GAO, C.; MENG, F.-L.; LI, H.-H.; WANG, L.; LIU, J.-H.; HUANG, X.-J. SnO₂/reduced graphene oxide nanocomposite for the simultaneous electrochemical detection of cadmium(ii), lead(ii), copper(ii), and mercury(ii): an interesting favorable mutual interference. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 1, p. 1034-1041, 2012.

⁸⁰ CINCOTTO, F. H.; MORAES, F. C.; MACHADO, S. A. S. Graphene nanosheets and quantum dots: A smart material for electrochemical applications. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 16, p. 4746-4753, 2014.

⁸¹ ERTAN, B.; EREN, T.; ERMIŞ, İ.; SARAL, H.; ATAR, N.; YOLA, M. L. Sensitive analysis of simazine based on platinum nanoparticles on polyoxometalate/multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 470, n. Supplement C, p. 14-21, 2016.

⁸² LOPEZ, M. A.; MARTOS, F. C. Iron availability: an updated review. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 597-606, 2004.

⁸³ GEISSER, P. In vitro studies on interactions of iron salts and complexes with food-stuffs and medicaments. **Arzneimittelforschung**, v. 40, n. 7, p. 754-60, 1990.

- ⁸⁴ BURCKHARDT-HEROLD, S.; KLOTZ, J.; FUNK, F.; BUCHI, R.; PETRIG-SCHAFFLAND, J.; GEISSER, P. Interactions between iron(III)-hydroxide polymaltose complex and commonly used drugs / simulations and in vitro studies. **Arzneimittelforschung**, v. 57, n. 6a, p. 360-9, 2007.
- ⁸⁵ BURGESS, J. **Ions in solution: basic principles of chemical interactions**. Amsterdam: Elsevier, 1999. 232 p.
- ⁸⁶ SCHNEIDER, W. Cheminform abstract: iron hydrolysis and the biochemistry of iron. The interplay of hydroxide and biogenic ligands. **ChemInform**, v. 19, n. 24, p. 9-20, 1988.
- ⁸⁷ KIDANE, T. Z.; SAUBLE, E.; LINDER, M. C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 291, n. 3, p. C445-55, 2006.
- ⁸⁸ TAKAGI, H.; SHI, D.; HA, Y.; ALLEWELL, N. M.; THEIL, E. C. Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18685-8, 1998.
- ⁸⁹ THEIL, E. C.; MATZAPETAKIS, M.; LIU, X. Ferritins: iron/oxygen biominerals in protein nanocages. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 803-10, 2006.
- ⁹⁰ FOYE, W. O.; TURCOTTE, J. G. Stability of metal complexes of nuclear-substituted salicylic acids - correlation with biological effects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 329-332, 1962.
- ⁹¹ DAVIS, P. S.; DELLER, D. J. Salicylates and iron absorption. **Gastroenterology**, v. 52, n. 4, p. 691-694,
- ⁹² ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R.; SPECTOR, N.; COVAS, D.; REGO, E. **Tratado de hematologia**. São Paulo, Atheneu, 2013. 899 p.
- ⁹³ GARRIDO, J.; LIMA, J.; MATOS, C. D. Flow injection determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations with an amperometric detector. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 65, n. 6, p. 954-962, 2000.
- ⁹⁴ DOULACHE, M.; BENCHETTARA, A.; TRARI, M. Detection of salicylic acid by electrocatalytic oxidation at a nickel-modified glassy carbon electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 51-56, 2014.
- ⁹⁵ TORRIERO, A. A. J.; LUCO, J. M.; SERENO, L.; RABA, J. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 247-254, 2004.

- ⁹⁶ SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA, R. C.; FATIBELLO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 360-366, 2009.
- ⁹⁷ ZHANG, W. D.; XU, B.; HONG, Y. X.; YU, Y. X.; YE, J. S.; ZHANG, J. Q. Electrochemical oxidation of salicylic acid at well-aligned multiwalled carbon nanotube electrode and its detection. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, n. 9, p. 1713-1718, 2010.
- ⁹⁸ DEVADAS, B.; MADHU, R.; CHEN, S. M.; YEH, H. T. Controlled electrochemical synthesis of new rare earth metal lutetium hexacyanoferrate on reduced graphene oxide and its application as a salicylic acid sensor. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 43, p. 7515-7523, 2014.
- ⁹⁹ ELAHI, M. Y.; BATHAIE, S. Z.; KAZEMI, S. H.; MOUSAVI, M. F. DNA immobilization on a polypyrrole nanofiber modified electrode and its interaction with salicylic acid/aspirin. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n. 2, p. 176-184, 2011.
- ¹⁰⁰ JUNIOR, L. R.; NETO, G. D.; FERNANDES, J. R.; KUBOTA, L. T. Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix. **Talanta**, v. 51, n. 3, p. 547-557, 2000.
- ¹⁰¹ GHADIMI, H.; M.A.TEHRANI, R.; BASIRUN, W. J.; AB AZIZ, N. J.; MOHAMED, N.; AB GHANI, S. Electrochemical determination of aspirin and caffeine at MWCNTs-poly-4-vinylpyridine composite modified electrode. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 65, p. 101-109, 2016.
- ¹⁰² YIĞİT, A.; YARDIM, Y.; ÇELEBI, M.; LEVENT, A.; ŞENTÜRK, Z. Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 158, p. 21-29, 2016.
- ¹⁰³ SHAIDAROVA, L. G.; GEDMINA, A. V.; CHELNOKOVA, I. A.; BUDNIKOV, G. K. Selective determination of paracetamol and acetylsalicylic acid on electrode modified with a mixed-valent film of ruthenium oxide-ruthenium cyanide. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 620-627, 2011.
- ¹⁰⁴ WANG, Z. H.; LI, H.; CHEN, J.; XUE, Z. H.; WU, B. W.; LU, X. Q. Acetylsalicylic acid electrochemical sensor based on PATP-AuNPs modified molecularly imprinted polymer film. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1672-1679, 2011.
- ¹⁰⁵ WUDARSKA, E.; CHRZESCIJANSKA, E.; KUSMIEREK, E.; RYNKOWSKI, J. Voltammetric studies of acetylsalicylic acid electrooxidation at platinum electrode. **Electrochimica Acta**, v. 93, p. 189-194, 2013.

¹⁰⁶ CHRZESCIJANSKA, E.; WUDARSKA, E.; KUSMIEREK, E.; RYNKOWSKI, J. Study of acetylsalicylic acid electroreduction behavior at platinum electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p. 17-21, 2014.

¹⁰⁷ PAPENDICK, V. E.; SUTHERLAND, J. W.; WILLIAMSON, D. E. Pharmaceuticals and related drugs. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 190-248, 1969.

¹⁰⁸ AGREN, A. The complex formation between iron(iii)ion and some phenols .2. Salicylic acid and para-amino salicylic acid. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 8, n. 6, p. 1059-1072, 1954.

¹⁰⁹ KELLY, C. A. Determination of the decomposition of aspirin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1053-79, 1970.

¹¹⁰ MARTENS, J.; MEYER, F. P. Special qualification of a photometric procedure for determination of salicylic acid in therapeutic drug monitoring]. **Die Pharmazie**, v. 50, n. 1, p. 41-43, 1995.

¹¹¹ BANCROFT, E. E.; SIDWELL, J. S.; BLOUNT, H. N. Derivative linear sweep and derivative cyclic voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1390-1394, 1981.

¹¹² HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

¹¹³ JAFFÉ H. H., ORCHIM. M. **Theory and applications of ultraviolet spectroscopy**. New York: John Wiley, 1964. 624 p.

¹¹⁴ EDWARDS, L. J. The hydrolysis of aspirin: a determination of the thermodynamic dissociation constant and a study of the reaction kinetics by ultra-violet spectrophotometry. **Transactions of the Faraday Society**, v. 46, p. 723-735, 1950.

¹¹⁵ H. ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, B. E. C. A. W. B. A. S. The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces. **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 43, n. 1, p. 9-36, 1973.

¹¹⁶ BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamental and applications**. New York: Wiley Interscience, 2001. 833 p.

¹¹⁷ KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. Spectroelectrochemistry. In: ZOSKI. C. G. **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 591-635.

¹¹⁸ GILROY, D.; CONWAY, B. E. Kinetic Theory of inhibition and passivation in electrochemical reactions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 1259-1267, 1965.

- ¹¹⁹ DO PRADO, T. M.; CINCOTTO, F. H.; MACHADO, S. A. S. Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples. **Electrochimica Acta**, v. 233, p. 105-112, 2017.
- ¹²⁰ PATIL, D. B.; CHAFLE, D. M. Solubility determination of salicylic acids and its metabolite. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 6494-6500, 2008.
- ¹²¹ SILVESTER, D. S.; HE, W.; ALDOUS, L.; HARDACRE, C.; COMPTON, R. G. Electrochemical reduction of benzoic acid and substituted benzoic acids in some room temperature ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 33, p. 12966-12973, 2008.
- ¹²² BUETTNER, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 259-303, 1987.
- ¹²³ SAWYER, D. Synovial fluid analysis of canine joints. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 609, 1963.
- ¹²⁴ CSUKA, M. E.; MCCARTY, D. J. Aspirin and the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 15, n. 3, p. 439-54, 1989.
- ¹²⁵ FRIES, J. F.; RAMEY, D. R.; SINGH, G.; MORFELD, D.; BLOCH, D. A.; RAYNAULD, J. P. A reevaluation of aspirin therapy in rheumatoid arthritis. **Archives of International Medicine**, v. 153, n. 21, p. 2465-71, 1993.
- ¹²⁶ MUNDT, L. A. **Exame de urina e de fluidos corporais de graff**. São Paulo: Artmed, 2012. 352 p.
- ¹²⁷ TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday.1. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.
- ¹²⁸ COMEAU, F.; SURETTE, C.; BRUN, G. L.; LOSIER, R. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. **Science of The Total Environment**, v. 396, n. 2, p. 132-146, 2008.
- ¹²⁹ PAPAGEORGIOU, M.; KOSMA, C.; LAMBROPOULOU, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. **Science of The Total Environment**, v. 543, p. 547-569, 2016.
- ¹³⁰ MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Edinburgh: Pearson Education Limited, 2005. 268 p.
- ¹³¹ DO PRADO, T. M.; MACHADO, S. A. S. Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2569-2574, 2016.

- ¹³² BRESLOW, R. **Organic reaction mechanism an introduction**. New York: W.A. Benjamin, 1969. 144 p.
- ¹³³ SYKES, P. **A guide book to mechanism in organic chemistry**. Cambridge: Wiley, 1986. 416 p.
- ¹³⁴ WUDARSKA, E.; CHRZESCIJANSKA, E.; KUSMIEREK, E.; RYNKOWSKI, J. Voltammetric studies of acetylsalicylic acid electrooxidation at platinum electrode. **Electrochimica Acta**, 189-194 p. 2013.
- ¹³⁵ ALBARRAN, G.; BOGGESE, W.; RASSOLOV, V.; SCHULER, R. H. Absorption spectrum, mass spectrometric properties, and electronic structure of 1,2-benzoquinone. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 28, p. 7470-7478, 2010.
- ¹³⁶ KOKOT, Z.; BURDA, K. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, n. 4, p. 871-875, 1998.
- ¹³⁷ SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley, 2014. 464 p.
- ¹³⁸ ZAUGG, S.; ZHANG, X.; SWEEDLER, J.; THORMANN, W. Determination of salicylate, gentisic acid and salicyluric acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 752, n. 1, p. 17-31, 2001.
- ¹³⁹ NENCKI, M.; SIEBER, N. Articles on gastric juices and the chemical composition of enzymes. **Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, v. 32, n. 3/4, p. 291-319, 1901.
- ¹⁴⁰ SHRIVER, D.; ATKINS, P.; LANGFORD, C. **Inorganic chemistry**. Oxford: Oxford University, 1994. 819 p.
- ¹⁴¹ COTTON, A. F.; WILKINSON, G.; BOCHMANN, M.; MURILLO, C. A. **Advanced inorganic chemistry**. New York: Wiley, 1999. 1355 p.
- ¹⁴² GROTO, H. Z. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2008.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples.

Electrochimica Acta 233 (2017) 105–112

Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples

Thiago M. do Prado^{a,*}, Fernando H. Cincotto^b, Sergio A.S. Machado^a^a São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, SP, Brazil^b Chemistry Department, Federal University of São Carlos, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2016

Received in revised form 2 March 2017

Accepted 5 March 2017

Available online 6 March 2017

Keywords:

spectroelectrochemical

voltabsorptometry

graphene

gold nanoparticles

acetylsalicylic acid

ABSTRACT

This paper describes the application of simultaneous electrochemical reduction and UV absorbance methods (spectroelectrochemical techniques, highlighting the derivative linear scan voltabsorptometry) in the determination of acetylsalicylic acid in neutral medium, using a platinum gauze electrode modified with nanocomposite of reduced graphene oxide with gold nanoparticles (rGO/AuNPs). In solution, the process involving one electron to produce the radical acetylsalicylate was observed. Such mechanism was confirmed by electronic paramagnetic resonance (EPR). This study demonstrated that the voltabsorptometric sensor is highly sensitive for the determination of acetylsalicylic acid, with a limit of detection of $0.26 \mu\text{mol L}^{-1}$. No significant interference was detected for ascorbic and uric acid in the determination of acetylsalicylic acid. The platinum gauze with rGO/AuNPs modified electrode device was successfully applied in the acetylsalicylic acid determination in environmental samples (wastewater) and clinical (tablets of drugs and human urine) samples, and is a promising platform for a simple, rapid, direct and very sensitive analysis of acetylsalicylic acid.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Painkillers are the most popular class of pharmaceuticals, being consumed in huge amounts throughout the world. Among them, acetylsalicylic acid (ASA) is, by far, consumed in the larger scale. This is also related with its medicinal properties for the treatment of headache (even migraine), muscle aches, arthritis, toothaches, backaches, fever, flu, thromboembolic disorders, colorectal cancer, etc. [1,2], and ASA can be sold without a prescription in some countries. The amount consumed each year is estimated to be around one hundred billion tablets.

However, ASA has an important drawback regarding human health. It is readily hydrolyzed to salicylic acid in acidic environments such as the human stomach. Salicylic acid promotes a series of hazardous effects in the human body including gastrointestinal ulcers, tinnitus and Reye's syndrome [3]. To avoid its hydrolysis in the stomach, advanced formulations of ASA are available in aspirin delayed-release tablets, which stabilize ASA until the pH neutralizes allowing for drug release and adsorption in the intestine.

Supposing that only 40% of the ingested pills are eliminated from the body in their original chemical form or as metabolites, the pollution potential from this drug is enormous. Several research studies indicate that pharmaceuticals are one of the main contaminants in environmental waters due to their partial metabolism by the human body, subsequent urinary or fecal excretion and their inefficient removal from water in sewage treatment plants [4–9]. Furthermore, an increased demand for ASA leads to increased production, resulting in a greater volume of wastewater containing pharmaceutical waste.

Analytical techniques have been developed to measure trace levels of ASA directly in water or its metabolites in urine samples. These methodologies include techniques such as capillary liquid chromatography [10], high performance liquid chromatography [11,12], fluorimetry [13] and voltammetry [14,15] among others. Reliable detection of ASA in natural water is becoming increasingly important due to its chronic toxicity and the side effects that can occur when it is continuously ingested [16,17]. It is also critical to control incidental ingestion of ASA in tropical countries where diseases that cause generalized bleeding, such as infection by Zika, dengue or chikungunya viruses, can be aggravated by the ability of ASA to inhibit platelet aggregation [18–26].

Considering the urgent need for methods to detect non-metabolized ASA in neutral environmental samples, in this work

* Corresponding author at: São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, CP 380, CEP 13566-590, São Carlos, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3373 9924; fax: +55 16 3373 9903.

E-mail address: thipra@gmail.com (T.M. d. Prado).

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples. (*continuação*).

106

T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

we developed a protocol to identify this pollutant using spectroelectrochemical techniques. We highlight the capabilities of derivative linear sweep voltabsorptometry (DLSVA), which is considered a more sensitive analytical technique in applications involving complex matrices relative to other electrochemical techniques such as voltammetry. In principle, this technique combines electrochemical and optical signals at the molecular level, measuring absorbance in the ultraviolet region during oxidation-reduction processes [27].

One interesting material that has been widely used in the development of electroanalytical sensors is reduced graphene oxide (rGO). rGO has characteristics similar to graphene nanosheets, i.e. a singular two-dimensional structure formed by a few layers of sp^2 carbon atoms generating a π -conjugated system leading to high electron mobility and fast charge transfer, which gives the appearance of an electrocatalytic effect. rGO can serve as a solid support for the immobilization of several species and can be used as platform for the development of biosensors and sensors including enzymes [28], DNA [29], biomarker [30], quantum dots [31,32], metallic oxides [32] and metallic nanoparticles [33].

This work describes the synthesis, characterization and application of a spectroelectrochemical sensor based on gold nanoparticles (AuNPs) supported on rGO immobilized on a platinum gauze electrode. This nanostructured material had excellent sensitivity for ASA due to its high electrocatalytic activity, yielding a very low detection limit. We demonstrate that a platinum gauze electrode modified with rGO/AuNPs is a fast, simple and sensitive tool to measure the levels of ASA in clinical and environmental samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

All solutions were prepared using purified water from a Barnstead Nanopure System (Thermo Scientific, USA) with a resistivity $\geq 18.2 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. The following analytical grade reagents were used without further purification: ASA, KNO_3 and 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) (Sigma-Aldrich), H_2SO_4 (Tedia), H_2O_2 and NaOH (Synth). Graphite powder (< 20 micron, Sigma), potassium permanganate (KMnO_4 , Sigma-Aldrich), hydrogen peroxide (H_2O_2 – Synth), sodium nitrate (NaNO_3 – Sigma-Aldrich), HAuCl_4 and sodium citrate purchase from Sigma-Aldrich.

2.2. Apparatus and procedures

Cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry experiments were performed using an AUTOLAB potentiostat, model PGSTAT 128N (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands). Spectrophotometric measurements were performed on an Avaspec 2048 spectrophotometer (Avantes, Apeldoorn, Netherlands) integrated with an Avaspec DHS radiation UV–vis source (Avantes, Apeldoorn, Netherlands), with deuterium and halogen lamps and a support for cuvettes. Connections to the spectrophotometer were made via optical fibers. The spectroelectrochemical cell used (Basi, West Lafayette, USA) was a bucket with an optical path of 0.1 cm and contained an arrangement of three electrodes: platinum gauze was the working electrode; the system $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ (3.0 mol L^{-1}) was the reference electrode; and a platinum wire was the auxiliary electrode. The volume used for all experiments in the spectroelectrochemical cell was $800 \mu\text{L}$.

Electronic paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained in an EMXplusTM X-band spectrometer (Bruker, Billerica, USA) at the temperature of liquid nitrogen.

Pre-treatment of the platinum gauze was performed in two steps. First, the gauze was immersed in a piranha solution of

$\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1 v/v) for 3 min. Then it was washed with ultrapure water and subjected to cyclic voltammetry in a $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ solution with a potential range between 1.30 V and -0.23 V in the following stages: 100 cycles at 1 V s^{-1} , 50 cycles at 0.50 V s^{-1} , 25 cycles at 0.25 V s^{-1} and 10 cycles at 0.10 V s^{-1} .

2.3. Synthesis of graphene oxide

Single layer graphene oxide (GO), prepared according to the modified Hummers method [34]. Typically, 10 g of graphite and 10 g of NaNO_3 was mixed with 450 mL of H_2SO_4 (98%) in a 2500 mL flask. The mixture was then stirred for 30 min in an ice bath, and subsequently 60 g of KMnO_4 was added with vigorous stirring. The reaction mixture was then kept at 4°C for 24 h. Next, the mixture was stirred vigorously at 35°C and 450 mL of H_2O was added. The reaction temperature was rapidly increased to 98°C and 450 mL more H_2O was added, followed by 300 mL of a 30% H_2O_2 aqueous solution. The reaction mixture was refrigerated again at 4°C for 24 h. The GO solution obtained was centrifuged for 30 min at 8000 rpm and washed several times with 5% HCl and then distilled water until the pH of the filtrate was neutral. Finally, the GO was lyophilized for 24 h.

2.4. Synthesis of rGO/AuNPs

The nanocomposite material was prepared by dispersing 150 mg GO in 150 mL double-distilled water by ultrasound treatment for 30 min. Subsequently, 1.0 mL of HAuCl_4 ($2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) was added to the reaction flask. The mixture was heated to boiling under continuous magnetic stirring and then $750 \mu\text{L}$ of a 1% (w/v) sodium citrate solution was added. After 5 min of boiling, 100 mg NaBH_4 in 5 mL of water was added. The mixture was stirred with heating for another 30 min, then cooled to room temperature and filtered. The resulting solid was repeatedly washed with water and ethanol, dried under vacuum at room temperature and kept dry until use.

To evaluate the synergistic effect of rGO and AuNPs, the chemical synthesis of rGO alone was also performed as described above except HAuCl_4 was not added.

3. Results and discussion

3.1. Scanning electron microscopy images and transmission electron micrographs

Scanning electron microscopy (SEM) images for the rGO/AuNPs hybrid material were obtained using backscattered electrons at a magnification of 250,000X and are presented in Fig. 1. Nanoparticles of gold are represented by bright white spots and were homogeneously distributed throughout the rGO nanosheets.

To gather further information about the structure of rGO and the rGO/AuNPs hybrid material, transmission electron microscopy (TEM) images were evaluated. The rGO and rGO/AuNPs nanosheet images are shown in Fig. 2a and Fig. 2b, respectively. Particle diameters were measured directly from the TEM images using ImageJ software (Fig. 1S, supplementary material). From those images we obtained a mean value of $5.65 \pm 1.64 \text{ nm}$ for immobilized AuNPs in the reduced graphene sheet.

To confirm the formation of Au nanoparticles on the rGO nanosheets, energy dispersive X-ray analysis (EDX) was performed and counts were obtained to verify the presence of the metal in the synthesized hybrid nanomaterial (data not shown). The TEM micrographs and EDX analysis confirmed the incorporation of AuNPs deposited on the rGO in the hybrid rGO/AuNPs material, which was consistent with the SEM images.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and enviromental samples. (*continuação*).

T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

107

Fig. 1. SEM images of the rGO/AuNPs hybrid material.

Fig. 2. TEM images of graphene nanosheets (a) and rGO/AuNPs material (b).

3.2. Absorbance spectrophotometry UV-vis measurements

The acidity of the electrolyte influenced ASA hydrolysis as demonstrated in the UV absorbance spectra (Fig. 3) for 5.0×10^{-3} molL⁻¹ ASA in (a) 0.1 molL⁻¹ H₂SO₄ and (b) 0.1 molL⁻¹ KNO₃ aqueous solutions. In the acidic solution, ASA had characteristic absorbance bands at 243 nm, corresponding to an aromatic ring, and at 275 nm, for substituent groups in their non-ionized form. It underwent slow hydrolysis catalyzed by protons, generating salicylic acid as the main product. In the absorption spectra, this caused the appearance of a shoulder around 310 nm (Fig. 3a), which is associated with salicylic acid (whose spectrum is included for comparison, dashed lines). Edwards [35] demonstrated that in the pH range of 5.5–9.0 the ASA hydrolysis reaction was much slower than in acidic conditions and was promoted by the attack of a water molecule on the compound in a pH-independent manner. The appearance of a very small shoulder in the UV-vis absorption spectrum around 310 nm corresponded to the formation of salicylic acid (Fig. 3b).

3.3. Electrochemical behavior of ASA

CV experiments were performed to electrochemically characterize ASA in a neutral solution. A 2.5×10^{-3} molL⁻¹ ASA solution in 0.1 M KNO₃ was analyzed by CV with different electrode compositions (Pt, rGO and rGO/AuNPs). The resulting voltammograms obtained at 20 mVs⁻¹ in the specific potential window are presented in Fig. 4. The voltammograms contain a pair of redox peaks with the oxidation process occurring at $E_{pa} = -0.359$ V and the corresponding reduction occurring at $E_{pc} = -0.494$ V. The shape

Fig. 3. UV Absorbance spectra of 5.0×10^{-3} molL⁻¹ ASA, (a) 0.1 molL⁻¹ H₂SO₄ (b) 0.1 molL⁻¹ KNO₃, after hydrolysis for the several times indicated in the Figure. Dashed lines represent the responses of a control sample containing salicylic acid.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and enviromental samples. (*continuação*).

108

T.M. Prado et al./Electrochimica Acta 233 (2017) 105–112

Fig. 4. Voltammograms for investigation of electrochemistry behavior of 2.5×10^{-3} mol L⁻¹ ASA in 0.1 mol L⁻¹ KNO₃ on platinum (dot), rGO (dash) and rGO/Au (line). Scan rate 20 mV s⁻¹.

and separation of these peaks are indicative of a quasi-reversible process. The voltammogram obtained for the GC/rGO/AuNPs electrode showed the highest and best defined potential-current profile, which was expected due to the synergetic association of rGO with the nanoparticles. In this way, GC/rGO/AuNPs electrode was selected for all subsequent experiments performed in this work.

Chrzescijanska and Wudarska [36] proposed that the electrochemical activity of ASA on platinum electrodes was associated with its hydrolysis product, salicylate ions, and formed an anion radical in the reduction process. However, the authors based their mechanism on an initial attack of ASA by water molecules leading to salicylate ions which consequently generated the voltammetric response observed for ASA. By contrast, the UV absorbance spectrophotometry experiments in this study revealed that in KNO₃ solutions ASA hydrolysis does not take place and ASA itself is the electrochemically active species prior to the cyclic voltammetry. Thus, the potential values obtained in our experiments can be assigned directly to ASA redox behavior.

3.4. Spectroelectrochemical measures

Based on the results discussed in the previous section, the mechanism proposed in the literature for the oxi-reduction of ASA is not supported by our experimental results, especially when employing additional techniques to characterize the products formed [36,37]. Therefore, the use of spectroelectrochemical measurements becomes a differential analysis for the electrochemical behavior of organic compounds. There are examples in the literature where spectroelectrochemical techniques are employed for quantitative analysis, such as flow injection analysis, chronoamperometry associated with UV-vis spectrophotometry [38], CV with UV-Vis-NIR (NIR, near infrared) [39] and CV with Raman spectroscopy [40].

Simultaneous collection of optical spectroelectrochemical UV-vis data with voltammetric data enables the number of electrons involved in reduction and oxidation processes and the molecular changes on the surface of the working electrode to be determined. These features make spectroelectrochemistry the most promising methodology for elucidating the oxi-reduction mechanisms of organic chromophores.

The combination of electrochemical responses to changes in the molecular structure of ASA was obtained by monitoring the UV-vis spectrum during the reduction process under controlled potential. By this method it was possible to evaluate the identity of the

electrolysis compound in regions where the reaction rate was controlled by diffusion of the species to the surface of the working electrode.

Coulometry under controlled potential is the usual method for determining the number of electrons (n) involved in electrolysis reactions. The charge involved in the electrolysis process was used to calculate n using Faraday's Law (Equation (1)), where Q is the charge involved in the process, n is the number of electrons, N is the number of moles and F Faraday's constant ($96,485 \text{ C mol}^{-1}$) [41]. The efficiency of electrolysis depends on the relation between the electrode area and the volume of the solution used (A/V). Therefore, the process has greater efficiency for large areas when the volume of the electrolyte is kept constant. The spectroelectrochemical cell has characteristics favorable for conducting experiments on electrolysis, since the volume of the solution used is small (800 μL) and the platinum gauze is in contact with the solution in a small cuvette compartment (path length = 0.1 cm). In this situation the mass transport takes place by linear diffusion during the electrolysis process with relatively short time intervals [42].

$$Q = n.F.N \quad (1)$$

Measurement of the UV-vis spectrum was taken simultaneously with the passage of charge during electrolysis. The potential value was chosen so that the mass transport to the electrode surface was diffusion controlled, ensuring the occurrence of high efficiency experiments.

For ASA, the coulometry at -0.69 V in neutral medium resulted (Fig. 5) in a charge transfer of -35.5 mC (Fig. 5a), which was determined by a decrease in the absorbance values of the

Fig. 5. Measures for spectroelectrochemical monitoring of 2.5×10^{-3} mol L⁻¹ ASA in 0.1 mol L⁻¹ KNO₃, (a) coulometric response at -0.69 V , time 480 s and (b) spectra.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples. (continuação).

T.M. Prado et al. / Electrochimica Acta 233 (2017) 105–112

109

acetylsalicylate spectra, the deprotonated form of ASA (Fig. 5b, see discussion in section 3.2). A specific analysis of the secondary band peaking at 275 nm allowed the observation of a hypsochromic displacement of 275 nm to 267 nm. This information suggested a decrease in conjugation in the compound and indicated a possible transition to a higher energy state. Lambert-Beer's Law (Equation 2) was applied to the initial spectrum of $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ASA at 243 nm, and the calculated value of $\epsilon = 1520 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was in agreement with literature values [43]. By substituting this value from the spectrum obtained at the end of electrolysis, the number of moles involved in the electrolysis, $N = 4.7 \times 10^{-7} \text{ mol}$, was calculated. Using this data and Faraday's Law (Equation 1), the apparent number of electrons involved in this process was found to be one.

$$A = b \epsilon c \quad (2)$$

A possible mechanism for the reduction of acetylsalicylate involving one single electron must include the formation of a radical anion, as shown in Scheme 1. The formation of the radical was suggested by increased energy in the system as evidenced by displacement of the middle band in the UV–vis absorbance spectrum, which is characteristic of a hypsochromic effect. The existence of an oxidation peak in the reverse scan showed that the radical anion was stable under experimental conditions. This type of mechanism was also observed by Silvester et al. [44] in the formation of radical anions from the electrochemical reduction of some benzoate and benzoate substituted.

3.5. EPR measurements

Most radicals are so reactive that they exist only in extremely dilute solutions. The presence of these reactive radicals can often be revealed by the magnetic properties of the unpaired electron. EPR spectroscopy is a technique that can be used to study species containing one or more unpaired electrons. This method is very sensitive and can detect free radicals in concentrations as low as 10^{-8} M . It provides information on the nature of the radical and its structure (conformation, configuration and location of unpaired electrons) [45].

In this study, identification of the radical formed by the electrolysis process was performed in a cathodic potential with a frequency at the X-band (9.50 to 9.81 GHz), a modulation amplitude of 1 G, a modulation frequency of 100 KHz, a detector gain of 5×10^4 and a radio frequency power of 2 mW.

Based on kinetic criteria, the lifetime of radicals can be classified as short-lived (stabilized or destabilized), stable and persistent [46,47]. In this work, the direct detection of free radicals in the electrolyte solution did not occur under the experimental conditions employed (it took approximately 3 min to insert the sample in the EPR measurement system). For this situation, a special feature was adopted to identify the formed radical, i.e. *spin trapping*. This method involved reaction of the interested free radical with a diamagnetic compound, imprisoning the spin and prolonging the free radical lifetime [48,49].

Fig. 6 shows the EPR spectrum of the solution containing the free radical produced during electrolysis that was *spin trapped* in

Fig. 6. EPR spectra for solution containing ASA electrolysis product and DMPO at 77 K.

DMPO. The data suggest that the radical cation proposed in Scheme 1 transferred its electron to molecular oxygen dissolved in solution, thus generating a superoxide radical that immediately reacted with water forming the superoxide adduct DMPO-OOH that was *spin trapped*. According to Scheme 2, the superoxide formed adduct decomposed to form DMPO-OH hydroxide which has increased stability and can be detected experimentally. The value of the coupling constant, $a = 15.0$, confirmed formation of the proposed adduct hydroxide. Detection of the hydroxide adduct has been used to monitor decomposition of superoxide adducts in work where superoxide was generated by direct or indirect means [47–49].

3.6. Analytical characteristics of ASA

For the identification and quantification of ASA we employed DLSVA. This technique provides information about the spectroelectrochemical processes occurring on the electrode surface at the molecular level. Electrochemical processes were monitored while optical signals were obtained by UV absorbance spectrophotometry. The results are expressed as the optical signal derived from the potential function (Equation (3)), which is analogous to that calculated from an equation of faradaic processes, the Randles-Sevcik formula [27].

$$(dA_R/dE)_p = \beta n^{1/2} \epsilon_R D_0^{1/2} C_0^* \nu^{-1/2} \quad (3)$$

The technical advantage is in its direct application to complex matrices which may be present numerous electroactive substances. However, the selectivity of the technique is due to the monitoring of the specific optical signal to the analyte of interest that varies in potential inherent to processes of oxidation-

Scheme 1. Proposed mechanism for reducing acetylsalicylate.

Scheme 2. Formation of superoxide radical, adduct DMPO-OOH and its decomposition generating adduct DMPO-OH.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and enviromental samples. (*continuação*).

110

T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

Fig. 7. Linear voltabsorptograms for (a) absence, (b) $0.88 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $1.23 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $1.58 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $1.93 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $2.28 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $2.63 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $2.80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ASA in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. Scan rate 20 mV s^{-1} , wavelength 275 nm . Inset: linear regression obtained for calibration curve.

reduction studied so species potential peaks and optical signal coincide.

The constructed calibration curve for ASA quantification at 275 nm are presented in the inset of Fig. 7, and is represented by the linear equation $dA_{275nm}/dE = -0.02 + 0.18 [\text{ASA} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, $R^2 = 0.9992$ which allows the calculation of a limit of detection (LOD) value of $0.26 \mu\text{mol L}^{-1}$.

All experiments were performed in triplicate according to the statistical method discussed by Miller and Miller [50,51]. Where LOD equals 3 times $S_{y/x}$ divided by the slope. The $S_{y/x}$ statistic estimates the random errors in the y-direction and was calculated from equation (4). The equation uses the y-residuals, $y_i - \hat{y}_i$, where the $\hat{y}_i$ -values are the points on the calculated regression line corresponding to the individual x-values, i.e. the 'fitted' y-values.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (4)$$

Good performance of the method was demonstrated by reproducibility performed via comparison of slopes obtained from 3 calibrations curves, where the relative standard deviation (RSD) obtained was 0.89%. The repeatability experiments where performed for 10 consecutive determinations of $1.84 \mu\text{mol L}^{-1}$ ASA with RSD = 4.87%.

The LOD value obtained by DLSVA was compared to a calibration curve constructed by linear scanning voltammetry, ($I/\mu\text{A} = -0.06 + 0.74 [\text{ASA} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, $R^2 = 0.9987$, LOD = $0.27 \mu\text{mol L}^{-1}$, Fig. S2), where the LOD of the curves were close. However the signals obtained for DLSVA are dependent on amount of reduced analyte and not on the current generated during the process, which

Table 2

Quantification of ASA in spiked real samples.

Sample	Added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery (%)
Wastewater A	–	–	–
Wastewater B	0.88	0.83	94.32
Wastewater C	1.05	1.00	95.24
Wastewater D	1.93	1.82	94.30
Tablet A	–	0.25	–
Tablet B	0.53	0.55	103.77
Tablet C	1.05	1.07	101.90
Tablet D	1.23	1.28	104.07
Urine A	–	0.26	–
Urine B	1.58	1.80	113.92
Urine C	1.75	1.95	111.43
Urine D	1.93	1.99	103.11

allows the application of this technique to optically transparent thin-layer electrodes of different materials.

Some recently published results for quantification of ASA through electrochemical methods are summarized in Table 1 and these results are in agreement with data obtained in this work. The advantage of DLSVA over other electrochemical methods is the possibility for simultaneous identification of the electrochemical reaction product, which can help minimize the effects of the matrix.

The interferents ascorbic acid and uric acid were tested separately and in mixtures containing about three times more of the interferents than ASA. All experiments showed no electrochemical response in the cathodic potential region where ASA reduction occurs.

3.7. Analysis of real samples

We quantified ASA in real samples collected from wastewater, tablets and urine. Wastewater samples were collected from a stream located in the city of São Carlos, São Paulo state, Brazil ($S22^{\circ}00.725'/W047^{\circ}54.428'$) in the vicinity of a hospital that serves the local population. A stock solution containing $5.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ASA was prepared from tablets available in the local market. These were macerated and solubilized in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ and then filtered with a quantitative filter paper. Subsequently, dilute solutions of known concentration were prepared from the stock solution. Urine samples were collected from a patient who continuously uses ASA to control thromboembolic disorders.

The identification of ASA in all real samples was evaluated by spiking with ASA solutions of varying concentration in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. The results are summarized in Table 2.

These results demonstrate the relevance of DLSVA for quantification of ASA in complex matrices from commercial, environmental and medicinal sources.

4. Conclusion

DLSVA was used to determine the number of electrons involved in an ASA reduction reaction, supporting a reaction mechanism involving one electron via formation of the radical anion acetylsalicylate. The mechanism, which was confirmed by EPR experiments, consisted of immediate transfer of the electron acquired in the electrochemical step to molecular oxygen dissolved in the solution generating a DMPO-OH adduct, and ultimately, a spin trapped DMPO. Variation of the drug during electrolysis was monitored by absorbance at 275 nm , which allowed for simultaneous measurement of the optical response to the cathodic peak potential of -0.359 V , and monitoring by DLSVA permitted quantification of ASA with considerable selectivity in a representative sample of residual water (a complex matrix).

Table 1

Comparison between experimental data from distinct electrochemical methods for ASA quantification.

Technique	LOD/ mol L^{-1}	Linear range/ mol L^{-1}	Reference
DPV	5.24×10^{-6}	0.05×10^{-3} to 1×10^{-3}	[52]
SWV	0.01×10^{-6}	0.02×10^{-6} to 100×10^{-6}	[14]
DPV	0.3×10^{-9}	1×10^{-9} to 1×10^{-7}	[53]
DPV	1.19×10^{-9}	0.04×10^{-6} to 350×10^{-6}	[54]
SWV	4.11×10^{-8}	1.39×10^{-7} to 2.78×10^{-5}	[55]
DLSVA	0.26×10^{-6}	0.88×10^{-6} to 2.80×10^{-6}	This work

Key: LOD, limit of detection; DPV, differential pulse voltammetry; SWV, square wave voltammetry; DLSVA, derivative linear sweep voltabsorptometry.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and environmental samples. (*continuação*).

T.M. Prado et al. / *Electrochimica Acta* 233 (2017) 105–112

111

This work contributes significantly to the development of methods for spectroelectrochemically identifying emerging pollutants with chromophore characteristics in real samples.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP for funding resources through Processes no:2013/17053-0 and 2016/16565-5 (F. H. Cincotto), CNPq no: 471389/2013-7 process and CAPES process no: 1423455 for granted doctoral fellowship to T. M. Prado as well as to Prof. Douglas Wagner Franco (*in memoriam*) by EPR analyzes performed on equipment purchased by FAPESP no 2006/53266-4 process.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2017.03.038>.

References

- [1] M. Gerber, J.C. Breytenbach, J. Hadgraft, J. du Plessis, Synthesis and transdermal properties of acetylsalicylic acid and selected esters, *Int J Pharm* 310 (2006) 31–36.
- [2] B.J. Sanghavi, A.K. Srivastava, Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode, *Electrochim Acta* 55 (2010) 8638–8648.
- [3] Y. Wang, P.-P. Xu, X.-X. Li, K. Nie, M.-F. Tu, B. Kong, J. Chen, Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber-optic dissolution system, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2 (2012) 386–389.
- [4] J. Rivera-Utrilla, M. Sanchez-Polo, M.A. Ferro-García, G. Prades-Joya, R. Ocampo-Pérez, Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review, *Chemosphere* 93 (2013) 1268–1287.
- [5] M. Stumpf, T.A. Ternes, R.D. Wilken, S.V. Rodrigues, W. Baumann, Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Sci Total Environ* 225 (1999) 135–141.
- [6] T.A. Ternes, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res* 32 (1998) 3245–3260.
- [7] F. Comeau, C. Surette, G.L. Brun, R. Losier, The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada, *Sci Total Environ* 396 (2008) 132–146.
- [8] A. Ziyani, N.J. Ince, The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes, *J Hazard Mater* 187 (2011) 24–36.
- [9] M. Papageorgiou, C. Kosma, D. Lampropoulou, Seasonal occurrence removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece, *Sci Total Environ* 543 (2016) 547–569.
- [10] Y. Moliner-Martínez, A. Ribera, E. Coronado, P. Campins-Falco, Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 2276–2283.
- [11] A.W. Abu-Qare, M.B. Abou-Donia, A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine, *J Pharmaceut Biomed* 26 (2001) 939–947.
- [12] M.R. Payan, M.A.B. Lopez, R. Fernandez-Torres, M.C. Mochon, J.L.G. Ariza, Application of hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewaters, *Talanta* 82 (2010) 854–858.
- [13] X.Y. Xu, B. Yan, Selective detection and controlled release of Aspirin over fluorescent amino-functionalized metal-organic framework in aqueous solution, *Sensor Actuat B-Chem* 230 (2016) 463–469.
- [14] R.N. Goyal, S. Bishnoi, B. Agrawal, Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples, *J Electroanal Chem* 655 (2011) 97–102.
- [15] M. Purushotham, P. Gupta, R.N. Goyal, Graphene modified glassy carbon sensor for the determination of aspirin metabolites in human biological samples, *Talanta* 143 (2015) 328–334.
- [16] T. Burnett, R. Katiyal, R. Alam, Mechanisms of Aspirin Desensitization, *Immunol Allergy Clin* 33 (2013) 223.
- [17] C.N. Floyd, A. Ferro, Mechanisms of aspirin resistance, *Pharmacol Therapeut* 141 (2014) 69–78.
- [18] J.F.W. Chan, G.K.Y. Choi, C.C.Y. Yip, V.C.C. Cheng, K.Y. Yuen, Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease, *J Infection* 72 (2016) 507–524.
- [19] P.M. de Salazar, A. Suy, A. Sanchez-Montalva, C. Rodo, F. Salvador, I. Molina, Zika fever, *Enferm Infect Microbiol Clin* 34 (2016) 247–252.
- [20] C. Zanluca, C.N.D. dos Santos, Zika virus – an overview, *Microbes Infect* 18 (2016) 295–301.
- [21] C. Pooja, Y. Amrita, C. Viney, Clinical implications and treatment of dengue, *Asian Pac J Trop Med* 7 (2014) 169–178.
- [22] M.P. Cariappa, A.S. Bansal, M. Dutt, K.P. Reddy, Dengue in the deserts: Search and Destroy Operations, *Medical Journal Armed Forces India* 71 (2015) 76–78.
- [23] C. Wattal, N. Goel, Infectious Disease Emergencies in Returning Travelers Special Reference to Malaria, Dengue Fever, and Chikungunya, *Med Clin N Am* 96 (2012) 1225.
- [24] M. Madariaga, E. Ticona, C. Resurrección, Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world, *Braz J Infect Dis* 20 (2016) 91–98.
- [25] E.J. Kuchars, I. Gebula-Byrska, Chikungunya fever, *Eur J Intern Med* 23 (2012) 325–329.
- [26] R. Abdelnabi, J. Neyts, L. DeLang, Towards antivirals against chikungunya virus, *Antivir Res* 121 (2015) 59–68.
- [27] E.E. Bancroft, J.S. Sidwell, H.N. Blount, DERIVATIVE LINEAR SWEEP AND DERIVATIVE CYCLIC VOLTAMMOMETRY, *Analytical Chemistry* 53 (1981) 1390–1394.
- [28] O. Parlak, A. Tiwari, A.P.F. Turner, A. Tiwari, Template-directed hierarchical self-assembly of graphene based hybrid structure for electrochemical biosensing, *Biosens Bioelectron* 49 (2013) 53–62.
- [29] F. Li, Y. Feng, C. Zhao, P. Li, B. Tang, A sensitive graphene oxide-DNA based sensing platform for fluorescence turn-on detection of bleomycin, *Chem Commun* 48 (2012) 127–129.
- [30] Q.T. Chen, C. Yu, R.F. Gao, L.L. Gao, Q.Y. Li, G.L. Yuan, J.L. He, A novel electrochemical immunosensor based on the rGO-TEPA-PTC-NH₂ and AuPt modified C-60 bimetallic nanoclusters for the detection of VagI, a potential biomarker for dysontogenesis, *Biosens Bioelectron* 79 (2016) 364–370.
- [31] Y. Wei, C. Gao, F.L. Meng, H.H. Li, L. Wang, J.H. Liu, X.J. Huang, SnO₂/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite for the Simultaneous Electrochemical Detection of Cadmium(II), Lead(II), Copper(II), and Mercury(II): An Interesting Favorable Mutual Interference, *J Phys Chem C* 116 (2012) 1034–1041.
- [32] F.H. Cincotto, E.C. Moraes, S.A.S. Machado, Graphene Nanosheets and Quantum Dots: A Smart Material for Electrochemical Applications, *Chem-Eur J* 20 (2014) 4746–4753.
- [33] B. Ertan, T. Eren, I. Ermis, H. Saral, N. Atar, M.L. Yola, Sensitive analysis of simazine based on platinum nanoparticles on polyoxometalate/multi-walled carbon nanotubes, *J Colloid Interf Sci* 470 (2016) 14–21.
- [34] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of Graphitic Oxide, *J Am Chem Soc* 80 (1958) 1339.
- [35] L.J. Edwards, The Hydrolysis of Aspirin – a Determination of the Thermodynamic Dissociation Constant and a Study of the Reaction Kinetics by Ultra-Violet Spectrophotometry, *T Faraday Soc* 46 (1950) 723.
- [36] E. Chrzescijanska, E. Wudarska, E. Kusmirek, J. Rynkowski, Study of acetylsalicylic acid electroreduction behavior at platinum electrode, *J Electroanal Chem* 713 (2014) 17–21.
- [37] E. Wudarska, E. Chrzescijanska, E. Kusmirek, J. Rynkowski, Voltammetric studies of acetylsalicylic acid electrooxidation at platinum electrode, *Electrochim Acta* 93 (2013) 189–194.
- [38] L. Leon, J.J. Maraver, J. Carbajo, J.D. Mozo, Simple and multi-configurational flow-cell detector for UV-vis spectroelectrochemical measurements in commercial instruments, *Sensors and Actuators B-Chemical* 186 (2013) 263–269.
- [39] J. Tarabek, P. Rapt, E. Jahne, D. Ferse, H.J. Adler, D. Maunz, L. Dunsch, Spectroelectrochemical and potentiometric studies of functionalized electroactive polymers, *Electrochim Acta* 50 (2005) 1643–1651.
- [40] B. Bozzini, C. Mele, L. D'Urzo, V. Romanelli, An electrochemical and in situ SERS study of Cu electrodeposition from acidic sulphate solutions in the presence of 3-diethylamino-7-(4-dimethylaminophenylazo)-5-phenylphenazinium chloride (Janus Green B), *Journal of Applied Electrochemistry* 36 (2006) 973–981.
- [41] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*, Wiley Interscience, New York, 2001.
- [42] T.E. Keyes, R.J. Forster, *Handbook of Electrochemistry*, in: C.G. Zoski (Ed.), 2007 Dublin.
- [43] D.B. Patil, D.M. Chaffle, Solubility determination of salicylic acids and its metabolite, *Asian J. Chem.* 20 (2008) 6494–6500.
- [44] D.S. Silvester, W.S. He, L. Aldous, C. Hardacre, R.G. Compton, Electrochemical reduction of benzoic acid and substituted benzoic acids in some room temperature ionic liquids, *J Phys Chem C* 112 (2008) 12966–12973.
- [45] F. Gerson, W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [46] I. Yamazaki, L.H. Piette, T.A. Grover, Kinetic-Studies on Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Radicals Generated in NADPH-Cytochrome-P-450 Reductase-Paraquat Systems – Effect of Iron Chelates, *J Biol Chem* 265 (1990) 652–659.
- [47] M. Mojovic, I. Spasojevic, M. Vuletic, Z. Vucinic, G. Bacic, An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes, *J Serb Chem Soc* 70 (2005) 177–186.
- [48] G.R. Buettner, Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528 V, *Free Radical Bio Med* 3 (1987) 259–303.

APÊNDICE – A: (Artigo) Spectroelectrochemical study of acetylsalicylic acid in neutral medium and its quantification in clinical and enviromental samples. (*continuação*).

112

T.M. Prado et al./Electrochimica Acta 233 (2017) 105–112

- [49] G.R. Buettner, The Spin-Trapping of Superoxide and Hydroxyl Free-Radicals with Dmso (5, 5-Dimethylpyrrolidine-N-Oxide) – More About Iron, Free Radical Res Com 19 (1993) 579–587.
- [50] J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson Education Limited, Edinburgh, 2005.
- [51] O.B. da Silva, S.A.S. Machado, Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination, Anal Methods-Uk 4 (2012) 2348–2354.
- [52] M.Y. Elahi, S.Z. Bathaie, S.H. Kazemi, M.E. Mousavi, DNA immobilization on a polypyrrole nanofiber modified electrode and its interaction with salicylic acid/aspirin, Anal Biochem 411 (2011) 176–184.
- [53] Z.H. Wang, H. Li, J. Chen, Z.H. Xue, B.W. Wu, X.Q. Lu, Acetylsalicylic acid electrochemical sensor based on PATP-AuNPs modified molecularly imprinted polymer film, Talanta 85 (2011) 1672–1679.
- [54] H. Ghadimi, R. M.A. Tehrani, W.J. Basirun, N.J. Ab Aziz, N. Mohamed, S. Ab Ghani, Electrochemical determination of aspirin and caffeine at MWCNTs-poly-4-vinylpyridine composite modified electrode, J Taiwan Inst Chem E (2016).
- [55] A. Yigit, Y. Yildirim, M. Gelebi, A. Levent, Z. Sentürk, Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations, Talanta 158 (2016) 21–29.

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium.

J Solid State Electrochem (2016) 20:2569–2574
DOI 10.1007/s10008-015-3106-2

ORIGINAL PAPER

Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium

Thiago M. do Prado¹ · Sergio A. S. Machado¹

Received: 23 October 2015 / Revised: 9 December 2015 / Accepted: 14 December 2015 / Published online: 30 December 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract An extensive comprehension of the salicylate electro-oxidation process is an important matter to allow the design of efficient techniques for the treatment of domestic and industrial sewage using advanced oxidation processes, as well as for its detection as an environmental pollutant in rivers, lakes, and watersheds. In this work, the oxidation of salicylate is studied in alkaline medium using cyclic voltammetry, chronoamperometry, ultraviolet-visible spectroscopy, and cyclic voltabsorptometry (DCVA). Moreover, Fourier transform infrared spectroscopy was used to characterize the reaction products formed during the electrolysis on chronoamperometric measurements. The time-derivative cyclic voltabsorptogram was obtained at a characteristic wavelength to allow the comparison with its cyclic voltammogram. The oxidation peak obtained from the cyclic voltammetry corresponds to a decarboxylation process involving an electron and generating phenoxy radicals, which are stabilized by dimerization. The monitoring by DCVA showed the formation of an electrolysis product identified as 2,2'-biphenyldiol, which allowed the proposition of an EC reaction mechanism composed by one electrochemical step followed by a chemical one.

Keywords Spectroelectrochemistry · Salicylate · Electro-oxidation · Cyclic voltabsorptometry

Introduction

The acetylsalicylic acid (ASA) is quickly hydrolyzed *in vivo* resulting in salicylic acid and acetic acid, Eq. 1. The pharmaceutical drug has the appearance of a white powder or white crystals and may have a slight odor, mainly caused by acetate. The commercial medicinal formulation can be found in tablets, which are only partially soluble in water but completely soluble in alcohol. ASA has a pK_a value of 3.5, being completely deprotonated in biological pH values (nearly 7.0). Each gram of acetylsalicylic acid is hydrolyzed to about 760 mg of salicylic acid. The ASA stability is maximum at pH values between 2 and 3, intermediate between pH 4 and 8, and minimum at pH values less than 2 and greater than 8 [1].

ASA is the most consumed drug in the world, with an estimated consumption of 120 billion tablets per year. This is due to its anti-inflammatory, analgesic, anti-pyretic properties, and also to its capability to prevent thromboembolic disorders, to reduce the incidence of colon cancer, and delay the onset of Alzheimer's disease. The standard recommended dosage for maximum analgesic effect is 20–100 mg/mL (0.11–0.56 mM) [2, 3]. Since the hydrolyzed drug is only partially metabolized in the body, the rest being excreted in the urine [3], and the unconsumed drugs can be improperly discarded, ASA can act as an environmental contaminant for rivers, lakes, and groundwater. Humans, due to the inefficiency of wastewater treatment stations, can absorb ASA residues by drinking water. In this way, it is important to study the ASA and its main sub-products, salicylic acid (SA) and salicylate, through their electrochemical behavior,

✉ Thiago M. do Prado
thiagoprado@usp.br

¹ Sao Carlos Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, CP 380, CEP 13566-590 Sao Carlos, Sao Paulo, Brazil

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. (continuação).

2570

J Solid State Electrochem (2016) 20:2569–2574

in order to remove or monitor the presence of such contaminants in the environment and foodstuff. There are numerous publications concerning the development of electrochemical sensors for ASA and its hydrolysis products. However, the development of such monitoring devices is focused on elucidating electrochemical processes from voltammetric [4–9] or amperometric [10–13] signals and is not concerned about exploring any possible chemical processes occurring in the reaction pathway.

The combination of electrochemical and spectroscopic techniques contributes to the elucidation of electron transfer reaction mechanisms and the understanding of fundamental molecular states at interfaces [14]. Such association, which is known as spectroelectrochemical technique, is generally performed *in situ* or *ex situ*. The *in situ* analysis occurs on the electrode surface at an electrochemical cell, under controlled potential and during the passage of current. In *ex situ* application, the electrode is removed from the electrochemical cell and is subjected to an analysis in air or vacuum. Although *ex situ* procedure allows a variety of analysis that is not possible in wet media, the electrode surface can undergo significant changes after its removal from the electrochemical cell [15].

Typically, *in situ* spectroelectrochemical investigations can access processes happening in the solution adjacent to the electrode or directly on its surface [15]. Thus, the aim of this study is to employ an *in situ* spectroelectrochemical technique, namely UV-Vis, for the investigation of the salicylate ion oxidation on polycrystalline platinum electrode, in alkaline medium.

Experimental

Reagents and solutions

All solutions were prepared with purified water from a Barnstead Nanopure System (Thermo Scientific, USA), with

Fig. 1 Cyclic voltammograms for a) $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH } 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ salicylate and b) $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. Scan rate 20 mVs^{-1}

Fig. 2 Calibration curve to salicylate determination at maximum absorbance 296 nm. Inset absorbance spectra for 1.14, 1.52, 1.90, 2.66, and 3.04 mmol L^{-1} salicylate

resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. All reagents used in this study were of analytical grade and were used without further purification. Sodium hydroxide was from Merck (Darmstadt, Germany), the reagents salicylic acid (SA) and KBr were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

Apparatus and procedures

Cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry experiments were performed using a model PGSTAT30 Autolab Electrochemical System (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands). Spectrophotometric measurements were performed in a device composed by a spectrophotometer Avaspec 2048 coupled through optic fibers to a light source Avalight-DHS and a holder for cuvette (Avantes, Apeldoorn, Netherlands). The spectroelectrochemistry cell (BASi, West Lafayette, USA) was a cuvette with optical path length of 1 mm assembled with a three-electrode electrochemical system: platinum gauze

Fig. 3 a) Chronoamperograms for $2.59 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ salicylate with controlled potential (0.85 V) and b) charge calculated for electrolysis

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. (continuação).

Fig. 4 UV-Vis spectra for (a) absence (b) before electrolysis and (c) after electrolysis

as a working electrode: Ag/AgCl/KCl (3.0 mol L⁻¹) as a reference electrode and a Pt wire as an auxiliary electrode.

For FT-IR characterization, the electrolysis product solution was evaporated overnight with controlled temperature of 100 °C. KBr disks were made with a total mass of 100 mg containing 1 mg of the remaining solid, which was submitted to measurements in a model IRAffinity 1 spectrophotometer (Shimadzu, Portland, USA), in the wavenumber window from 400 to 4000 cm⁻¹, resolution 4.0 and 36 scans. Background data were collected from the solid remaining after the

evaporation procedure of 0.1-M NaOH solution in the same experimental conditions.

All experiments were carried out at a 25 °C. The spectroelectrochemical measurements were performed in 0.1 M NaOH solution.

Results and discussion

CV of salicylate at platinum gauze electrode

In alkaline conditions, the carboxyl group of salicylic acid dissociates resulting in salicylate ions in an equimolar amount to the added acid. The electrochemical behavior of salicylate on the platinum gauze was investigated by CV in a potential range from 0.25 to 1.00 V with a scan rate of 20 mV s⁻¹. The voltammograms in the absence (b) and in the presence (a) of 2.5 mM salicylate using 0.1 M NaOH as supporting electrolyte are presented in Fig. 1. As shown in Fig. 1, there is no faradaic response in the blank solution of NaOH, except the currents due to oxygen evolution in the most positive branch of the voltammetric profile. The salicylate oxidation process occurs at +0.70 V. The anodic peak, *I*_a, corresponds to an irreversible process and is commonly used for the direct electrochemical determination of both SA and salicylate [16, 17].

The salicylate molecule is considered as an ortho-substituted phenol, as shown in a previous study [18].

Scheme 1 Proposed mechanism for oxidation of salicylate ion in alkaline medium

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. (continuação).

2572

J Solid State Electrochem (2016) 20:2569–2574

Fig. 5 Voltabsorptograms for (a) $2.50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ salicylate and (b) cyclic voltammetry (scan rate 10 mV s^{-1})

Oxidation of phenolic compounds in millimeter levels can frequently lead to the formation of polymeric films or dimers on the electrode surface [19].

UV-Vis spectrophotometry

The UV-Vis spectrophotometry is usually employed to determine SA, as the molecule has a characteristic absorbance band between 296 and 302 nm; however, depending on the environment where it may be, it could assume the dissociated form as salicylate ion [20, 21].

The characteristic band of salicylate ion at 296 nm is presented in Fig. 2. (inset) where it is possible to observe that it depends on the ion concentration, following the Lambert-Beer law. Salicylate solutions were studied in the concentration range from 1.14 to 3.04 mM. Considering the maximum absorbance peak at each concentration, a calibration curve was constructed and displayed in Fig. 2. The linear relationship for calibration curve is described by the equation: A_{296}

(a.u.) = $0.02 + 401.52 C^*$ (mol L^{-1}), $R^2 = 0.9973$. By interpolating this calibration curve, it is possible to find any unknown concentration of salicylate in a matrix of interest and, on an electrolysis experiment, the number of moles consumed during the oxidation reaction.

Spectroelectrochemistry

The spectroelectrochemical study was performed by simultaneous experiments of chronoamperometry and spectroscopy of salicylate ion in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. To perform this experiment, the electrode potential was fixed in $+0.85 \text{ V}$, in the diffusion-controlled region for salicylate oxidation, as observed in the voltammogram of Fig. 1. As the electrolysis is carried out, the charge spent to oxidize salicylate is inferred from the current-time curve, while the number of moles consumed in the reaction is obtained by the UV-Vis spectra. The results are presented in Fig. 3a, where the variation of the current on time is plotted for the electrolysis up to 480 s. With the integration of the area under the current transient curve, the charge involved was calculated as 0.19 C . The variation of the salicylate concentration in the electrolyte was monitored during the oxidation by light absorption at 296 nm, and the results are included in Fig. 4. It is important to note that the characteristic absorbance for the band at 296 nm, for salicylate ions, decreased with time indicating the consumption of this species on the electrode surface. Even though the band at 296 nm decreased on time, the formation of the reaction product yielded a new band with the maximum absorption in approximately 400 nm, but of lower intensity.

The change in the absorbance of salicylate in the electrolyte allowed the calculation of the number of moles consumed in the oxidation process as $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol}$. Using this information and the charge involved in the process, it was possible to calculate the number of electrons involved in the electrochemical reaction by Faraday's law, resulting in $n = 1.09$ (Eq. 2). This is a characteristic result as expected for any oxidation of a phenolic compound on the platinum surface in alkaline medium [19].

$$Q = nFN \quad (2)$$

Scheme 1 represents a possible mechanism for the formation of the salicylate product through electrolysis in alkaline medium, involving the transfer of one electron per salicylate molecule. In this proposal, the salicylate ion undergoes a decarboxylation through an electrochemical step, generating the phenoxy radical. The radical yields the formation of a dimer molecule, the 2,2'-biphenyldiol in a non-electrochemical step, with characteristic absorption band around 400 nm with a yellow color in accordance with the observed at the end of the experiments [22].

Fig. 6 FT-IR spectra for a salicylate and b electrolysis product. Scans 36 and resolution 4.0

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. (continuação).

J Solid State Electrochem (2016) 20:2569–2574

2573

Simultaneous potential scanning and light absorbance measurements confirmed the existence of both non-electrochemical and electrochemical stages during the electrolysis. The derivative of the optical signal in relation to the applied potential is showed in Fig. 5, which is known as a cyclic derivative voltabsorptometry, DCVA, and has a mathematical function similar to that of the Randles-Sevcik equation (Eq. 3) [14].

$$(dA_o/dE)_p = \beta n^{1/2} \xi D^{1/2} C^* \nu^{-1/2} \quad (3)$$

In this equation, $(dA_o/dE)_p$ is the derivative of the optical signal peak on potential applied; β is a constant, $-0.08810 \text{ mV}^{-1/2}$ for the derivative optical signal; n is the number of electrons involved in the electrochemical reaction; D is the diffusion coefficient; C^* bulk concentration of redox species and ν the scan rate.

With the potential variation between 0.00 and +1.00 V at a scan rate of 10 mV s^{-1} , it is possible to observe that the decarboxylation of the molecule of the phenoxy radical formation occurs +0.72 V. Simultaneous monitoring of the absorbance at 400 nm yielded a maximum value of absorbance associated to the dimer formation at +0.73 V, almost the same potential for the voltammetric oxidation peak of salicylate ion.

In addition, DCVA results allowed the calculation of the molar absorptivity of the formed product, $\xi = 5828$, relating to the peak $(dA_o/dE)_p = 1.27$. Values of molar absorptivity between 1000 and 10,000 can be associated to polycyclic aromatic compounds [23] as the supposed electrolysis product.

FTIR Spectroscopy

The FTIR spectroscopy measurements were used to investigate the occurrence of decarboxylation steps and formation of the dimer. In Fig. 6a, the spectrum for the salicylate is presented and compared to that obtained for the electrolysis product, included in Fig. 6b. The band characteristic for the asymmetric stretching of the carboxylate group of the salicylic acid is observed at 1654 cm^{-1} . After an exhaustive electrolysis, the band is no longer observed in the product. In the absence of the carboxylic group, the product showed a band at 3435 cm^{-1} corresponding to hydroxyl groups containing an intramolecular hydrogen bonding, as the structure proposed in Scheme 1.

Conclusions

Spectroelectrochemical investigations about the oxidation of salicylate in alkaline medium allowed the proposal of a mechanism for the process. It begins with the transfer of one electron per oxidized salicylate ion which, subsequently, undergoes decarboxylation generating the stabilized phenol radical product, finally reacting to form the 2,2'-bifenil diol dimer.

This characterizes the occurrence of EC steps featuring a Kolbe's electrolysis reaction, which one electron is involved in the oxidation of a carboxylate ion compound [24, 25].

The results obtained using coupled electrochemical and spectroscopic techniques, had greater assertiveness for the characterization of the product generated in the salicylate oxidation reaction in alkaline medium. This work contributes to future studies on the electrochemical area for the determination of salicylate in real water samples.

Acknowledgments The authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Proc. No. 2013/17053-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES for the financial support. The scholarship granted by CAPES to Thiago M. do Prado, is gratefully acknowledged.

References

1. Tanasescu S, Lkvesque H, Thuillez C (2000) Pharmacologic de l'aspirine. *Coeur Med Interne* 1:18–26
2. Lima NT, Santos RV (eds) (2010) Brazilian pharmacopoeia. Fiocruz, Brasília
3. Gerber M, Breytenbach JC, Hadgraft J, Plessis J (2006) Synthesis and transdermal properties of acetylsalicylic acid and selected esters. *Int J Pharm* 310:31–36
4. Purushotham M, Gupta P, Goyal RN (2015) Graphene modified glassy carbon sensor for the determination of aspirin metabolites in human biological samples. *Talanta* 143:328–334
5. Goyal RN, Bishnoi S, Agrawal B (2011) Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples. *J Electroanal Chem* 655:97–102
6. Zhang W, Xu B, Hong Y, Yu Y, Ye J, Zhang J (2010) Electrochemical oxidation of salicylic acid at well-aligned multiwalled carbon nanotube electrode and its detection. *J Solid State Electrochem* 14:1713–1718
7. Wang Z, Li H, Chen J, Xue Z, Wu B, Lu X (2011) Acetylsalicylic acid electrochemical sensor based on PATP–AuNPs modified molecularly imprinted polymer film. *Talanta* 85:1672–1679
8. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK (1984) Sensitive assay of hydroxyl free-radical formation utilizing high-pressure liquid-chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J Biochem Biophys Methods* 10:221–235
9. Shishkanova TV, Videnska K, Antonova SG, Krončák M, Fítl P, Kopecký D, Vmáta M, Kral V (2014) Application of polyaniline for potentiometric recognition of salicylate and its analogues. *Electrochim Acta* 115:553–558
10. Quintino MSM, Corbo D, Bertotti M, Angnes L (2002) Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta* 58:943–949
11. Junior LR, Neto GD, Fernandes JR, Kubota LT (2000) Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix. *Talanta* 51:547–557
12. Neumayr M, Sontag G, Pittner F (1995) Enzymatic sensor coupled to a flow-injection analysis system for the determination of salicylate. *Anal Chim Acta* 305:26–31
13. Carvalho RF, Machado DS, Mendes RK, Almeida ALJ, Moreira NH, Piazzetta MHO, Gobbi AL, Kubota LT (2010) Development of a disposable amperometric biosensor for salicylate based on a plastic electrochemical microcell. *Biosens Bioelectron* 25:2200–2204

APÊNDICE – B: (Artigo) Spectroelectrochemical study of salicylate in alkaline medium. (continuação).

2574

J Solid State Electrochem (2016) 20:2569–2574

14. Bancroft EE, Sidwell JS, Blount HN (1981) Derivative linear sweep and derivative cyclic voltabsorptometry. *Anal Chem* 53:1390–1394
15. Zoski CG (ed) (2007) *Handbook of electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam
16. Panchompoo J, Aldous I, Kabeshov M, Pilgrim BS, Donohoe TJ, Compton RG (2012) A green approach to fenton chemistry: mono-hydroxylation of salicylic acid in aqueous medium by the electrogeneration of fenton's reagent. *New J Chem* 36:1265–1272
17. Lu T, Tsai Y (2010) Electrocatalytic oxidation of acetylsalicylic acid at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrodes. *Sensors Actuators B Chem* 148:590–594
18. Torriero AAJ, Luco JM, Sereno L, Raba J (2004) Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta* 62:247–254
19. Lund H, Hammerich O (eds) (2001) *Organic electrochemistry*. Marcel Dekker, New York
20. Mohite SV, Rajpure KY (2015) Oxidative degradation of salicylic acid by sprayed WO₃ photocatalyst. *J Mater Sci Eng B* 200:78–83
21. Wang Y, Xu P, Li X, Nie K, Tuo M, Kong B, Chen J (2012) Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber optic dissolution system. *J Pharm Anal* 2:386–389
22. Mohanty J, Sapre AV, Saini RD, Mukherjee T, Pal H (2005) Photodissociation and photoionization mechanisms of 2,2'- and 4,4'-biphenyldiols: a laser flash photolysis study. *Res Chem Intermed* 31:47–61
23. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR (2001) *Introduction to spectroscopy*. Brooks Cole, Belmont
24. Sykes P (1986) *A guide book to mechanism in organic chemistry*. Wiley, New York
25. Breslow R (1969) *Organic reaction mechanism an introduction*. Benjamin, New York