

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

CAROLINE SANZ GOMES

CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
DE INTERESSE BIOLÓGICO EM ELETRODOS CONVENCIONAIS E
MODIFICADOS COM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS:
ANTICHAGÁSICOS E ANTIBIÓTICOS

Tese de Doutorado

Versão da tese corrigida

São Paulo

Data de depósito na CPG: 10/03/2020

CAROLINE SANZ GOMES

CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
DE INTERESSE BIOLÓGICO EM ELETRODOS CONVENCIONAIS E
MODIFICADOS COM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS: ANTICHAGÁSICOS
E ANTIBIÓTICOS

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do Título de Doutora em
Ciências: Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Pires Serrano

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP
Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S194c Sanz , Caroline G.
Caracterização voltamétrica e quantificação de compostos de interesse biológico em eletrodos convencionais e modificados com materiais nanoestruturados: antichagásicos e antibióticos / Caroline G. Sanz . - São Paulo, 2020.
154 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Serrano, Silvia Helena Pires
Coorientador: Brett, Christopher M. A.

1. caracterização eletroquímica. 2. voltametria. 3. amperometria. 4. antichagásicos. 5. antibióticos.
I. T. II. Serrano, Silvia Helena Pires, orientador.
III. Brett, Christopher M. A., coorientador.

“It’s all getting to be too much for me. I feel I’m out of my depth. I’m scared. I’m scared I’m going to do something stupid.”

“And if you do something stupid, what then?”

“Aren’t you scared of falling?”

“It’s sometimes a mistake to climb; it is always a mistake never even to make the attempt.”

“What are you saying? That I ought to go back? Not walk out? Is that what you’re saying? You’re just a dream. Listen, I’ve made up my mind.”

“If you do not climb you will not fall. This is true. But is that bad to fail, that hard to fall? Sometimes you wake up. Sometimes the fall kills you. And sometimes, when you fall, you fly.”

Conversa entre o Sonho e Todd Faber.
Neil Gaiman em *Fables and Reflections*, vol.
6, 1993.

Para meus pais
Eliane e José Antônio

Agradecimentos

a meus pais, *Eliane* e *José Antônio*, pelos ensinamentos, apoio e motivação, e principalmente pela paciência e saudade nestes difíceis últimos anos,

a *Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Pires Serrano*, por todos estes anos e por ser meu constante exemplo pessoal e profissional,

ao *Prof. Dr. Christopher M. A. Brett*, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na Universidade de Coimbra e por ter contribuído muito para o meu crescimento científico,

aos membros da banca, *Prof.^a Dr.^a Elizabeth Igne Ferreira*, *Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho* e *Prof. Dr. Mauro Bertotti*, pelas discussões que com certeza contribuirão muito para o aperfeiçoamento do trabalho,

ao *Ricardo Leote*, pelo incentivo, paciência, bom humor e companheirismo,

a *Prof. Dr. Elizabeth I. Ferreira*, *Ricardo Serafim*, *Leandro H. Andrade* e *Kevin Dias* pela colaboração,

a meus *amigos e colegas de trabalho*, *Melinda*, *Raphael*, *Otávio*, *Kevin* e *demais* pelos momentos durante este doutorado,

a meus *amigos distantes*, que mesmo assim sempre me acompanharam,

a todos que participaram desta evolução de alguma forma, seja direta ou indiretamente,

as instituições *CAPES*, *FAPESP* e *CNPQ*.

Sanz, C.G. **Caracterização voltamétrica e quantificação de compostos de interesse biológico em eletrodos convencionais e modificados com materiais nanoestruturados: antichagásicos e antibióticos** 2020 (154p.) Tese de doutorado no Programa de Química. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo

Resumo

A caracterização eletroquímica de duas classes de fármacos eletroativos foi realizada utilizando técnicas voltamétricas em solução aquosa. Os processos de redução do grupo nitro de dois candidatos a fármacos antichagásicos foram avaliados em eletrodo de carbono vítreo e a influência da diferença estrutural entre as moléculas foi observada através da estabilização de intermediários reativos de redução do grupo nitro. O composto *p*-NSF apresentou um processo de redução a mais do que o observado para o composto *m*-NSF, o qual foi atribuído à formação do nitro ânion radical, e, devido ao maior número de cânones de ressonância da estrutura radicalar formada (*p*-NSF^{•-}) apresentou maior tempo de meia vida em meio aquoso. Os demais processos observados foram similares para ambas as moléculas e foram atribuídos à geração do derivado nitroso em meio neutro e alcalino e a hidroxilamina em meio ácido. A interação de ambos os compostos com oxigênio e cisteína também foi realizada a fim de avaliar sua influência no processo de redução relacionado à formação do nitro ânion radical. A atividade biológica prevista de ambos os compostos foi discutida. Ademais, a caracterização eletroquímica da cefadroxila, um antibiótico β-lactâmico, foi realizada utilizando eletrodo de carbono vítreo. O processo de oxidação se inicia com a formação de um radical fenoxil e, após ataque nucleofílico pela água, derivados de catecol e resorcinol são formados e oxidados de acordo com um mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico (ECE). A comparação entre o perfil de oxidação eletroquímica da cefadroxila e da amoxicilina permitiu identificar o processo de oxidação do heteroátomo do enxofre, próximo ao anel β-lactâmico, comum para ambos os antibióticos. O coeficiente de difusão (D_0) calculado para a cefadroxila em solução tampão BR foi igual a $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. A formação de um complexo entre os íons Cu(II) e cefadroxila e amoxicilina foi confirmada usando voltametria cíclica. A curva analítica para a determinação de cefadroxila foi construída com dados obtidos em voltamogramas de pulso diferencial, baseados no primeiro processo de oxidação da porção fenólica, e o método foi aplicado com sucesso na quantificação de cefadroxila em amostras comerciais. A caracterização eletroquímica de cefadroxila também foi realizada utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com CNTs e AuNps, construído utilizando *drop-casting* de 4 μL de uma suspensão 0,2 % (m/v) de CNTs dispersos em 1,0 % (v/v) de ácido acético contendo 0,5 % (m/v) de quitosana, seguido de 2 camadas de dispersão de AuNps (4 μL cada camada). A oxidação da porção fenol da cefadroxila na superfície modificada ocorreu em um valor potencial ligeiramente menos positivo e com maior magnitude de corrente em comparação com o eletrodo de carbono vítreo sem modificação. A superfície modificada foi também caracterizada utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica, apresentando valores mais baixos de resistência à transferência de carga para a oxidação da cefadroxila. A construção da curva analítica foi realizada por amperometria com potencial aplicado de 0,74 V, utilizando o método da adição de padrão. Os limites estimados de detecção e quantificação foram de 0,222 μM e 0,739 μM, respectivamente. A determinação de cefadroxila em amostras comerciais de Duracel[®] apresentou altos valores de recuperação para cada adição de padrão e a quantidade do fármaco em cada cápsula foi concordante com o valor especificado com o fabricante.

palavras-chave: cefadroxila, nitrocompostos, antichagásicos, antibióticos β-lactâmicos, caracterização eletroquímica, voltametria, amperometria, eletrodos modificados.

Sanz, C.G. **Voltammetric characterization and quantification of compounds with biological interest using unmodified and modified electrodes with nanostructured materials: antichagasics and antibiotics** 2020 (154p.) – PhD Thesis – Graduate program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Abstract

The electrochemical characterization of two classes of electroactive drugs was carried out using voltammetric techniques in aqueous solution. The nitro group reduction processes of two candidates for antichagasic drugs were evaluated using a glassy carbon electrode and the influence of the structural difference between the molecules was observed through the stabilization of reactive nitro group reduction intermediates. Although the voltammetric profile observed for both compounds was similar, the *p*-NSF compound showed one reduction process that was not observed for the *m*-NSF compound, which was attributed to the formation of the nitro radical anion, which, due to the greater number of resonance structures (*p*-NSF^{•-} in comparison with *m*-NSF^{•-}), presented a longer half-life in aqueous medium. The other processes observed were similar for both molecules and were attributed to the generation of the nitrous derivative in neutral and alkaline media and hydroxylamine in acidic media. The interaction of both compounds with oxygen and cysteine was also performed in order to assess their influence on the reduction process related to the formation of the nitro radical anion. The predicted biological activity of both compounds was discussed. In addition, the electrochemical characterization of cefadroxila, a β -lactam antibiotic, was performed using a glassy carbon electrode. The oxidation process begun with the formation of a phenoxyl radical and, after a nucleophilic attack by water, derivatives of catechol and resorcinol were formed and oxidized, following an ECE mechanism. The comparison between the electrochemical oxidation profile of cefadroxila and amoxicillin allowed the identification of the oxidation process of the sulfur heteroatom, close to the β -lactam ring, common for both antibiotics. The diffusion coefficient (D_0) for cefadroxila was calculated as $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ in Britton-Robinson buffer solution. The formation of a complex between Cu(II) and cefadroxila and amoxicillin was confirmed using cyclic voltammetry. The analytical curve for the determination of cefadroxila was constructed with data obtained from differential pulse voltamograms, based on the first oxidation process of the phenolic portion, and the method was successfully applied in the quantification of cefadroxila in commercial samples. The electrochemical characterization of cefadroxila was also carried out using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles, constructed using a 4 μL drop-casting of a 0.2% (m/v) suspension of CNTs dispersed in 1,0% (v/v) of acetic acid containing 0.5% (w/v) of chitosan, followed by 2 layers of gold nanoparticles dispersion (4 μL each layer). The oxidation of the phenol portion of cefadroxila on the modified surface occurred at a slightly less positive potential value and with a higher current magnitude compared to the bare glassy carbon electrode. The modified surface was also characterized using electrochemical impedance spectroscopy, showing lower values of charge transfer resistance for the oxidation of cefadroxila. The construction of the analytical curve was performed by amperometry with an applied potential of 0.74 V, using the standard addition method. The estimated limits of detection and quantification were 0.222 μM and 0.739 μM , respectively. The determination of cefadroxila in commercial samples of Duracef[®] showed high recovery values for each standard addition and the amount of the drug in each capsule agreed with the specified value.

keywords: cefadroxila, nitrocompounds, antichagasic, β -lactam antibiotics, electrochemical characterization, voltammetry, amperometry, modified electrodes.

Sumário

1	CAPÍTULO 1 – ELETROQUÍMICA APLICADA À DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS ELETROATIVOS	19
1.1	Conceito [1–3]	20
1.2	Métodos eletroanalíticos [1,2]	23
1.2.1	Voltametria.....	24
1.2.2	Amperometria.....	31
1.3	Eletroquímica aplicada à determinação de fármacos eletroativos.....	32
2	CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE CANDIDATOS NITROCOMPOSTOS A FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS	35
2.1	Introdução.....	36
2.1.1	Doença de Chagas	36
2.1.2	Mecanismo de ação de nitrocompostos.....	37
2.1.3	Candidatos antichagásicos.....	41
2.2	Objetivos.....	44
2.3	Procedimento experimental	45
2.3.1	Materiais e Reagentes.....	45
2.3.2	Preparo de soluções	45
2.3.3	Instrumentação	46
2.3.4	Célula eletroquímica e sistema de eletrodos	46
2.3.5	Medidas eletroquímicas.....	46
2.4	Resultados e discussão	47
2.4.1	Caracterização voltamétrica dos compostos <i>p</i> -NSF e <i>m</i> -NSF	47
2.4.2	Influência do oxigênio.....	62
2.4.3	Influência da cisteína.....	63

2.4.4	Estabilização do $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ e previsão da atividade biológica	65
2.5	Conclusões	66
3	CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS	69
3.1	Introdução.....	70
3.1.1	Bactérias.....	70
3.1.2	Antibióticos.....	72
3.1.3	Caracterização eletroquímica de antibióticos β -lactâmicos	80
3.2	Objetivos	82
3.3	Procedimento experimental.....	82
3.3.1	Materiais e Reagentes	82
3.3.2	Preparo de Soluções	82
3.3.3	Instrumentação	83
3.3.4	Célula eletroquímica e sistema de eletrodos	83
3.3.5	Medidas eletroquímicas	84
3.3.6	Medidas Espectrofotométricas.....	85
3.4	Resultados e discussão	85
3.4.1	Caracterização voltamétrica de cefadroxila	85
3.4.2	Mecanismo de oxidação do cefadroxila em meio aquoso	95
3.4.3	Formação de complexos entre cefadroxila e amoxicilina e Cu(II)	97
3.4.4	Determinação eletroquímica de cefadroxila	99
3.5	Conclusões	102
4	CAPÍTULO 4 - CONSTRUÇÃO DE SENSORES BASEADOS EM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS	105
4.1	Introdução.....	106
4.2	Objetivos	110
4.3	Procedimento Experimental	110

4.3.1	Materiais e reagentes	110
4.3.2	Preparo de soluções	110
4.3.3	Instrumentação	112
4.3.4	Célula eletroquímica e sistema de eletrodos	112
4.3.5	Medidas eletroquímicas.....	114
4.3.6	Medidas espectrofotométricas.....	114
4.4	Resultados e discussão	115
4.4.1	Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado.....	115
4.4.2	Comportamento eletroquímico do cefadroxila no eletrodo modificado	123
4.4.3	Determinação eletroquímica de cefadroxila.....	124
4.5	Conclusões.....	128
	PERSPECTIVAS FUTURAS	130
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
	APÊNDICE I - TRATAMENTO ESTATÍSTICO EM EXPERIMENTOS	
	ELETROANALÍTICOS	142
	SÚMULA CURRICULAR	148
	ANEXO I – CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS (2016-2020)	150
	ANEXO II – CONTRIBUIÇÕES ACADÊMICAS (2016-2020).....	153
	ANEXO III - PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSO (2016-2020).....	154

CAPÍTULO 1

ELETROQUÍMICA APLICADA À DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FÁRMACOS ELETROATIVOS

Reações de transferência de carga ocorrem em diversos sistemas biológicos e estas podem ser simuladas, *in vitro*, utilizando métodos eletroquímicos, o que os transforma em uma ferramenta poderosa para estudar e tentar compreender eventos biológicos. Além disso, espécies biológicas vêm sendo utilizadas há anos como reagentes analíticos para reconhecimento molecular, o que permite o desenvolvimento de novas metodologias no campo da eletroanálise. Neste capítulo serão descritos os conceitos básicos referentes à eletroquímica e algumas de suas técnicas, principalmente aquelas em que se usa o potencial como forma de perturbação aplicada a um eletrodo de trabalho, obtendo-se como resposta um sinal de corrente. A variação de parâmetros experimentais utilizados, permite efetuar o cálculo de constantes de equilíbrio, valores de pK , entre outros.

1.1 Conceito [1–3]

Eletroquímica é o ramo da físico-química que avalia fenômenos de separação de carga, nos quais pode ocorrer (ou não) transferência de elétrons, tanto em uma fase (transferência de carga homogênea) como entre duas fases distintas (transferência de carga heterogênea). Para reações que ocorrem em eletrodos (interface eletrodo/solução) submetidos a uma perturbação externa, a transferência de elétrons entre o material eletródico e um composto alvo ocorre quando há possibilidade de o elétron ocupar o menor nível energético possível das fases envolvidas. Caso a perturbação no sistema promova um aumento na energia do material eletródico, o elétron é então transferido para a camada menos energética disponível do composto alvo, o qual sofre redução. Por outro lado, se a perturbação diminui a energia do último nível desocupado do eletrodo, o elétron é transferido no sentido inverso (para o eletrodo), e o composto sofre oxidação. A energia crítica na qual estes processos ocorrem está relacionada ao potencial padrão, E^0 , para as espécies químicas envolvidas no sistema e que se encontram em equilíbrio na interface eletrodo/solução. Sendo assim, estes fenômenos químicos podem ser avaliados através da aplicação de uma perturbação no sistema (potencial, corrente), a fim de obter informações termodinâmicas, cinéticas e analíticas de um composto alvo, tendo em vista a relação entre eletricidade e uma mudança química identificável.

Caso uma perturbação aplicada ao eletrodo produza um fluxo de corrente na interface eletrodo/solução proveniente de uma reação química, o processo envolvido é considerado faradaico, tendo em vista a proporcionalidade entre a quantidade de eletricidade e a magnitude da reação química promovida pela passagem a corrente. Porém, nem sempre reações químicas serão termodinamicamente ou cineticamente favoráveis em uma gama de potenciais e, neste caso, a adsorção e/ou dessorção de espécies da superfície do eletrodo podem ocorrer, com consequente mudança estrutural da camada interfacial, ainda que não

ocorra transferência de carga. Estes processos são considerados não-faradaicos (ou capacitivos). Usualmente, quando se avalia uma reação redox que ocorre na superfície de eletrodos, a corrente faradaica é a de interesse tendo em vista que é a resposta direta relacionada à mudança química de um analito alvo. Ainda assim, o sinal resultante detectado é composto por ambas as correntes faradaica e capacitiva, sendo que a última não depende da concentração do analito e sim da perturbação aplicada ao sistema, da força iônica do meio ou da área do eletrodo. Por isso, a incerteza atrelada à medida de concentrações baixas do analito, tendo em vista a magnitude da corrente capacitiva, deve ser considerada.

Considerando uma reação química que ocorre na superfície de um transdutor e que envolve a redução de uma espécie O na formação do composto R , com consumo de n elétrons, de acordo com $O + ne^- \rightarrow R$, uma série de etapas estão envolvidas, Figura 1.1.

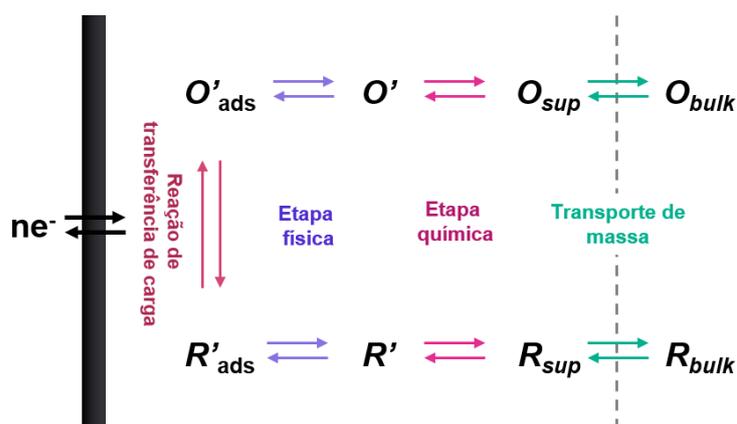


Figura 1.1. Esquema de reação eletrodica. Adaptado de [1].

Primeiramente, deve haver o transporte de massa do analito do interior da solução para a região interfacial (O_{bulk} corresponde à concentração da espécie O no seio da solução e O_{sup} à concentração da espécie na interface eletrodo/solução), seguido por mudanças químicas e/ou físicas que podem preceder a reação eletrodica, como reações de dimerização, decomposição, processos de adsorção e dessorção (O' corresponde à espécie O após sofrer

uma mudança química e O'_{ads} à espécie O após sofrer uma mudança física). Então a reação de transferência de carga entre a espécie e a superfície eletródica ocorre, gerando o produto R , o qual pode também sofrer mudanças físicas e químicas (R'_{ads} corresponde à espécie R após sofrer uma mudança física e R' à espécie R após sofrer uma mudança química). Todas as etapas descritas podem alterar a resposta final do processo observado.

Para um sistema ser considerado reversível, a velocidade de transferência de carga tem de ser muito superior à velocidade do transporte de massa e, nesta condição, as espécies encontram-se em equilíbrio na superfície eletródica $(a_{\text{ox}}/a_{\text{red}})_{\text{int}}$, tornando possível a utilização da equação de Nernst, já que as condições de reversibilidade termodinâmica são obedecidas, e quando $a_{\text{ox}} = a_{\text{red}}$, $E = E^0$.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \right)_{\text{int}} \quad (1.1)$$

Pelo contrário, um sistema é considerado irreversível quando a velocidade de transferência de carga é baixa e impede que haja o equilíbrio das espécies eletroativas oxidadas e reduzidas na superfície do eletrodo. Neste caso, há uma barreira cinética que é usualmente alcançada pela aplicação de um sobrepotencial (η). Sistemas quasi-reversíveis são constituídos por reações eletródicas que apresentam um comportamento intermediário. Nestes últimos casos, deve-se considerar a presença do coeficiente de transferência de carga (α_c , catódico e α_a , anódico), que representa uma medida da barreira da energia de ativação a ser ultrapassada.

Sendo assim, percebe-se que a reversibilidade eletroquímica é distinta da reversibilidade termodinâmica, já que essa depende de propriedades relacionadas às duas fases envolvidas no processo de transferência de carga. Por vezes, um processo é considerado irreversível (ou quase-reversível) eletroquimicamente, mas a reversibilidade

pode ser visualizada variando parâmetros experimentais empregados como, por exemplo, mudança do material eletrodico ou aumento na velocidade de varredura de potencial no qual a reação é avaliada eletroquimicamente.

1.2 Métodos eletroanalíticos [1,2]

Métodos eletroanalíticos são utilizados com vários propósitos, dentre eles, a caracterização eletroquímica de sistemas envolvendo os mais diversos analitos nas mais diversas matrizes e eletroanálise visando à quantificação do analito em sua matriz de origem. Quando a etapa de caracterização eletroquímica do sistema precede o desenvolvimento do método analítico, evita-se a pesquisa baseada em tentativa e erro. Evidentemente, a influência do meio eletrolítico e do material de eletrodo, assim como força iônica e pH do meio e eventual presença ou ausência de espécies interferentes fazem parte da caracterização do sistema.

Além disso, a versatilidade e baixo custo destes métodos quando aplicados em estudos mais complexos, como aqueles de interação do tipo fármaco-molécula alvo para atribuições de cunho biológico, também constitui uma vantagem significativa em comparação aos demais métodos comumente utilizados em metodologias analíticas.

Métodos eletroanalíticos interfaciais considerados dinâmicos são aqueles que envolvem a variação do potencial ou da corrente aplicada ao eletrodo de trabalho e, como resposta, se obtém um sinal eletroquímico mensurável (corrente, carga ou potencial) ao longo do tempo que é proporcional, direta ou indiretamente à concentração do analito.

As técnicas voltamétricas são frequentemente utilizadas na caracterização eletroquímica de fármacos eletroativos, já que permitem avaliar, *in vitro*, as características dos mesmos frente a moléculas que podem atuar como alvos biológicos *in vivo*,

possibilitando a proposição de mecanismos de ação. São ainda utilizadas na quantificação de princípios ativos em medicamentos ou em matrizes ambientais em que os fármacos descartados de maneira errada podem atuar como poluentes.

Para tal, faz-se necessária a utilização de uma célula eletroquímica, que é constituída por três eletrodos: eletrodo de trabalho, no qual a mudança química será avaliada, eletrodo de referência, que apresenta potencial constante e é usado para controlar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, por onde flui a corrente proveniente da reação eletroquímica. O eletrodo auxiliar deve possuir área superior à do eletrodo de trabalho para que a corrente seja limitada pelo tamanho do eletrodo de trabalho.

1.2.1 Voltametria

Em técnicas voltamétricas, a obtenção de informações acerca do comportamento redox de um determinado analito (processo faradaico) é obtida através da variação do potencial e registro da corrente resultante que se dá em função do potencial ($I = f(E)$). O transporte de massa do analito do interior da solução para a região interfacial não envolve processos de migração ou convecção, já que as medidas são efetuadas na presença de eletrólito suporte com concentração pelo menos 100 vezes superior à do analito e em soluções não agitadas. Assim, o transporte de massa se dá unicamente por difusão e é definido pelo coeficiente de difusão da espécie analisada em um determinado eletrólito.

A forma na qual a variação do potencial é aplicada constitui a principal diferença entre as técnicas voltamétricas amplamente utilizadas, promovendo um valor distinto relacionado à sensibilidade da metodologia. No caso da voltametria de varredura linear, a perturbação é aplicada na forma de uma rampa de potencial e, a corrente registrada em cada ponto é então ilustrada no voltamograma resultante. A voltametria cíclica, Figura 1.2, é uma técnica de voltametria linear, que apresenta a aplicação de uma rampa de potencial até um determinado

valor, e a posterior varredura no sentido reverso até o valor de potencial inicial. Com esta abordagem, é possível avaliar os processos de oxidação e redução presentes em um sistema em um único ciclo.

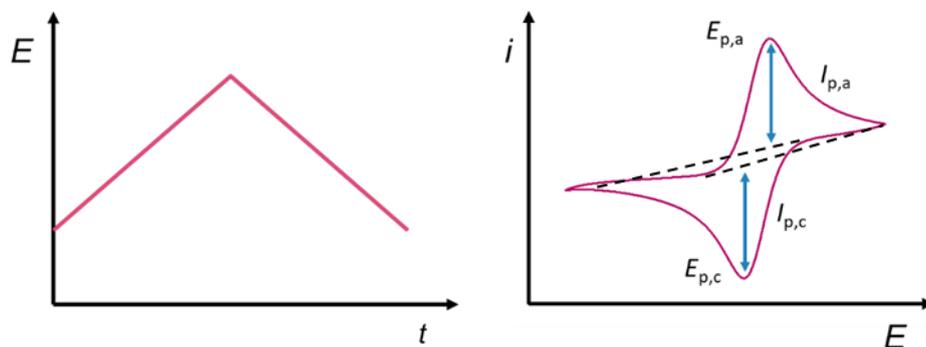


Figura 1.2. Perturbação na forma de rampa de potencial e voltamograma resultante.

A voltametria cíclica é uma das técnicas mais comuns de caracterização eletroquímica do comportamento redox de compostos eletroativos, tendo em vista que pode ser utilizada para diagnosticar mecanismo de reações eletroquímicas, indícios de reversibilidade, caracterizar espécies presentes em solução ou intermediários reativos além possibilitar o estudo da cinética de reações químicas.

Em sistemas reversíveis, a corrente cresce ao passo que o potencial necessário para o começo da transferência de carga é atingido, com a consequente difusão das espécies eletroativas para a região interfacial. Assim que o fornecimento destas espécies começa a decair, a corrente também diminui, seguindo um perfil proporcional a $t^{-1/2}$. Ao passo que a varredura é realizada no sentido inverso, o processo inverso também se repete da mesma forma. Para um processo reversível o valor de corrente é descrito pela equação de Randles-Sevcik, equação (1.2),

$$I_{p,c} = -2,99 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} [O]_{\infty} v^{1/2} \quad (1.2)$$

em que A é a área geométrica do eletrodo de trabalho (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão da espécie em um determinado eletrólito ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), n é o número de elétrons envolvidos na etapa determinante, $[O]_\infty$ é a concentração do analito no interior da solução (mol cm^{-3}), e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Neste caso, a diferença entre os potenciais de pico $|E_{p,c}$ e $E_{p,a}|$ é equivalente a $59/n$ mV, em que n é igual ao número de elétrons envolvidos e a razão $I_{p,a}/I_{p,c}$ é equivalente a 1. Além disso, tendo em vista a equação (1.2), percebe-se a proporcionalidade entre I_p e $v^{1/2}$, o que permite que esta equação seja empregada, quando sistemas reversíveis são considerados, para o cálculo das constantes envolvidas (coeficiente de difusão, área eletroativa, número de elétrons).

Em sistemas irreversíveis, o mesmo perfil voltamétrico é observado para uma reação, porém, nenhum processo é observado no sentido reverso. Neste caso, tendo em vista que as espécies não se encontram em equilíbrio na superfície eletródica durante o processo de transferência de carga, não só o potencial desloca-se para valores mais distantes de zero (quando comparados com sistemas reversíveis), como a corrente resultante varia de acordo com a equação (1.3),

$$I_{p,c} = -2,99 \cdot 10^5 n(\alpha n')^{1/2} A D_0^{1/2} [O]_\infty v^{1/2} \quad (1.3)$$

em que α corresponde ao coeficiente de transferência de carga heterogênea (barreira cinética) e n' corresponde ao número de elétrons na etapa determinante. Neste caso, tendo em vista a ausência do processo no ciclo reverso, $|E_{p,c}$ e $E_{p/2}|$ corresponde a $47,7 / (\alpha n')$ mV.

Estas duas abordagens são empregadas quando o transporte de massa não sofre influência de processos de adsorção previamente à transferência de carga. Quando fenômenos de adsorção são observados, (por exemplo, não há linearidade na curva I_p vs. $v^{1/2}$), outras considerações devem ser realizadas.

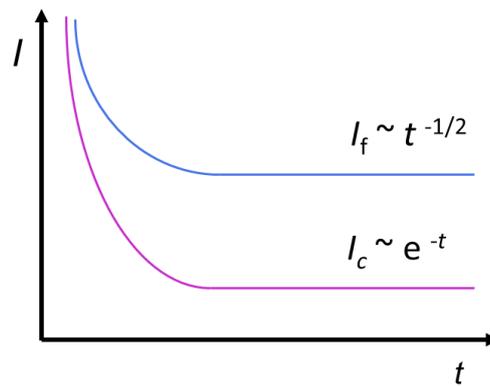


Figura 1.3. Dependência da corrente faradaica (linha azul, I_f) e capacitiva (linha rosa, I_c) em função do tempo sob aplicação de potencial.

Um dos problemas associados à utilização de voltametria cíclica é a contribuição da corrente capacitiva no sinal final obtido, já que $I_p = I_f + I_c$. Tendo em vista que uma está relacionada à transferência de carga e a outra está relacionada à separação de carga na interface eletrodo/solução, a dependência da corrente em cada caso segue a relação $I_f \sim t^{1/2}$ e $I_c \sim e^{-t}$, Figura 1.3.

Levando-se em consideração a escala de tempo em que ambas as correntes diminuem, é possível discriminar a corrente faradaica da corrente capacitiva, o que promoveria um aumento da sensibilidade da técnica, permitindo a quantificação de concentrações mais baixas de analito. Para tal, técnicas de pulso podem ser empregadas, já que o valor de corrente capacitiva é parcialmente subtraído da corrente final obtida para a construção dos voltamogramas.

Na voltametria de pulso diferencial, a aplicação da perturbação ao eletrodo de trabalho é realizada através de pulsos iguais de potencial sobre uma rampa, e o registro da corrente é realizado tanto no final do pulso (S_2) quanto no momento que o antecede (S_1). Como corrente resultante, $I_p = I_{s2} - I_{s1}$, tem-se uma resposta com maior sensibilidade (em

comparação à voltametria cíclica) já que a contribuição da corrente capacitiva na corrente resultante é descontada, Figura 1.4.

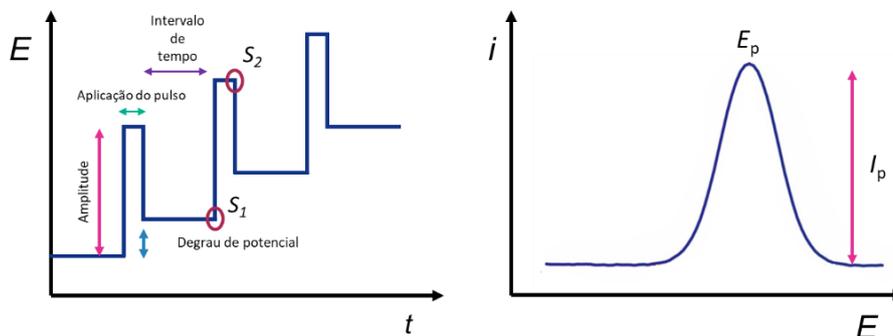


Figura 1.4. Perturbação na forma de degraus de potencial e voltamograma de pulso diferencial resultante.

O intervalo de tempo entre a aplicação de pulsos de potencial consecutivos deve ser pelo menos dez vezes superior à duração do pulso, com a finalidade de evitar que no próximo pulso, parte da corrente capacitiva seja considerada, Figura 1.5. Como consequência, a velocidade de varredura final de potencial utilizada na técnica é baixa, portanto não se recomenda ultrapassar valores superiores a $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A amplitude dos pulsos adotada também depende da relação $50/n \text{ mV}$, caso o número de elétrons da reação química seja conhecido, com a finalidade de obter melhor resolução do sinal. Quando este valor é muito elevado ($> 50/n \text{ mV}$), ainda que a corrente resultante seja superior (tendo em vista a equação (1.4) utilizada para um sistema reversível e controlado por difusão, que indica proporcionalidade entre estas duas variáveis), ocorre a diminuição da resolução do sinal eletroquímico através do aumento na largura do pico.

$$I_p = \left[\frac{(n^2 F^2 A [O]_{\infty})}{4RT} \right] \left[\frac{D_0}{\pi t} \right]^{1/2} \Delta E \quad (1.4)$$

em que I_p é a corrente de pico, ΔE é a amplitude de pulso, F a constante de Faraday, t é o tempo de duração do pulso.

Em termos de caracterização de um processo eletroquímico, a voltametria de pulso diferencial proporciona o cálculo estimado do número de elétrons que estão envolvidos na etapa determinante da reação redox, através do valor da diferença de potencial à meia altura de corrente ($W_{1/2}$). Para $\Delta E \rightarrow 0$,

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \cong \frac{90}{n} \text{ mV} \quad (1.5)$$

A baixa velocidade de varredura de potencial utilizada na voltametria de pulso diferencial faz com que o transporte de massa deixe de ser um fator limitante e com isso limitações cinéticas podem vir a interferir na reversibilidade do sistema.

Para transpor a desvantagem relacionada ao longo de tempo de análise quando se utiliza a voltametria de pulso diferencial, pode-se utilizar a voltametria de onda quadrada, que usualmente é conduzida em velocidades de varredura de potencial mais altas, sem a perda de sensibilidade. Neste caso, a aplicação da perturbação de potencial é realizada na forma de uma onda quadrada sobreposta a uma rampa de potencial, Figura 1.5.

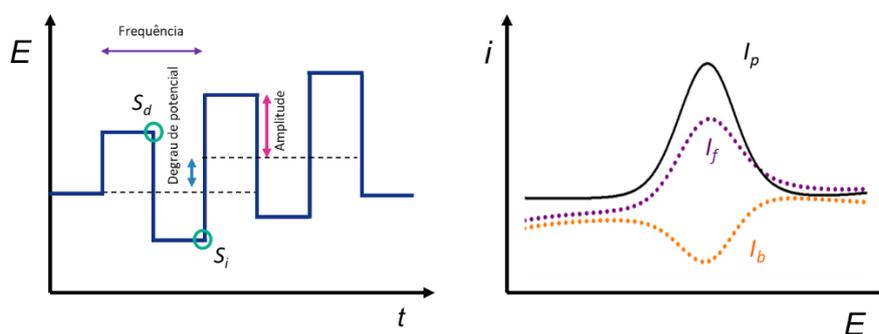


Figura 1.5. Perturbação na forma de ondas quadradas de potencial e voltamograma de onda quadrada resultante.

O potencial inicial aplicado é uma mediana dos potenciais extremos, positivo e negativo, da onda quadrada, a qual segue no sentido direto e reverso. A magnitude de cada pulso corresponde à metade da amplitude entre picos do sinal de onda quadrada, e a frequência é relacionada ao tempo que cada onda quadrada é aplicada ($f = 1/\tau$). As correntes são registradas durante os últimos microssegundos de cada pulso, direto (I_f) e reverso (I_b), Figura 1.6, e a diferença entre a corrente medida em dois pulsos sucessivos do mesmo passo é registrada como uma corrente resultante ($I_p = I_f - I_b$). Tendo em vista a forma de aplicação da perturbação de potencial, dois sinais são registrados: o sinal referente à reação que ocorre no sentido de potencial a qual a varredura é realizada (caso seja no sentido positivo, a corrente é referente ao processo anódico e vice versa), e o sinal referente à reação que ocorre no sentido reverso (caso seja no sentido positivo, a corrente é referente ao processo catódico e vice versa). Como exemplo, para uma reação $O + 1e^- \rightarrow R$, tem-se que o sinal direto relacionado a reação de redução da espécie O para a formação da espécie R corresponde a corrente direta I_f . Caso a reação de redução seja reversível, o sinal da componente reversa, I_b , corresponderá a reação do consumo de R na formação da espécie O. A soma de ambos os valores de corrente permite uma contribuição significativa para a sensibilidade da técnica, tanto por eliminar a linha base da corrente capacitiva, quanto por incluir na corrente resultante a contribuição de duas semi-reações, promovendo, assim, maior sensibilidade. Já que não há necessidade de um alto tempo de espera entre a aplicação das ondas quadradas, esta técnica pode ser realizada em velocidades de varredura altas, sem perda de sensibilidade, conforme mencionado previamente. Porém, o ganho em sensibilidade é limitado pela natureza da reação química, tendo em vista que, para um sistema irreversível, a corrente reversa não contribui para a corrente resultante. Para uma reação reversível controlada por difusão, a corrente resultante é proporcional a $f^{1/2}$.

O valor da amplitude do pulso também interfere na resolução do sinal final observado em voltametria de onda quadrada, assim como o observado em voltametria de pulso diferencial. Usualmente, o valor utilizado corresponde a $50/n$ mV, valor limite para a realização de medidas analíticas. De fato, a utilização da voltametria de onda quadrada pauta entre duas utilizações comuns: observação do mecanismo relacionado a uma reação química (conferir se há indícios de reversibilidade) e eletroanálise. Neste último caso, com a finalidade de aumentar ainda mais a sensibilidade, frequentemente utilizam-se etapas de pré-concentração de um analito alvo na superfície eletródica (*stripping*).

1.2.2 Amperometria

A amperometria é uma técnica eletroanalítica que envolve a medição da corrente ao longo do tempo resultante da aplicação de um valor de potencial constante, Figura 1.6. Assim, a corrente faradaica correspondente a um processo de oxidação ou redução de um analito alvo e é controlada pelo transporte de massa (difusão) [4], o que reflete o gradiente de concentração na superfície eletródica, de acordo com a *equação de Cottrell* (1.6),

$$I(t) = I_d(t) = \frac{nFAD_0^{1/2} [O]_{\infty}}{(\pi t)^{1/2}} \quad (1.6)$$

Se a concentração do analito alvo é conhecida, a técnica pode ser utilizada para obter informações cinéticas (coeficiente de difusão da espécie, D_0 , constante de velocidade heterogênea, k), mecanísticas (número de elétrons envolvidos) e até mesmo relacionadas a propriedades do material eletródico (área eletroativa).

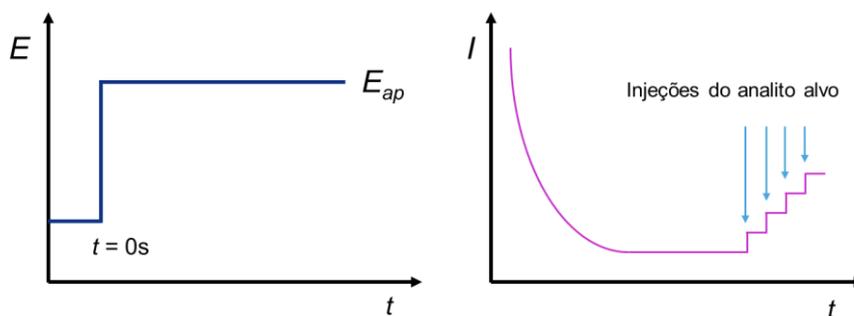


Figura 1.6. Perturbação na forma de degrau de potencial e amperograma resultante indicando a adição de concentrações iguais de um analito alvo.

Amperometria também pode ser empregada em eletroanálise, já que a corrente faradaica é diretamente proporcional à concentração em solução de um analito alvo. Nesse caso, usualmente o transporte de massa ocorre por convecção, para que a determinação eletroquímica não seja influenciada por limitações difusionais, Figura 1.7.

O potencial utilizado deve ser suficiente para promover a mudança química do analito alvo. Ainda que a sensibilidade deste método seja considerável, esta não ultrapassa a sensibilidade observada em voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada. Ainda assim, a amperometria é frequentemente utilizada no estudo de eletrodos modificados, e na avaliação de interferentes, como por exemplo em estudos envolvendo biossensores e avaliação da inibição enzimática.

1.3 Eletroquímica aplicada à determinação de fármacos eletroativos

Conforme previamente ilustrado, a utilização de voltametria e amperometria na determinação de um analito alvo possibilita a compreensão da relação entre eletricidade e uma mudança química mensurável e, para tal, pode ser aplicada na determinação e caracterização de compostos de interesse biológico tendo em vista que boa parte destes sofrem processos de transferência de carga.

No desenvolvimento de fármacos, desde sua descoberta até sua aplicação comercial, informações detalhadas quanto as suas características químicas devem ser realizadas com a finalidade do controle de qualidade, testes de estabilidade, obtenção de informações farmacocinéticas, e monitoramento da eficiência biológica, usualmente utilizando técnicas como espectrometria, cromatografia, ressonância magnética nuclear e espectroscopia, ainda que estas apresentem alto custo e por vezes procedimentos complexos de tratamento de amostra [5]. Métodos eletroquímicos têm sido utilizados na área farmacêutica, tendo em vista muitas de suas vantagens, como baixo custo, alta velocidade de análise, sensibilidade, baixa utilização de reagentes tóxicos e possibilidade de definir o mecanismo de ação e a cinética de reação quando aplicados em sistemas biológicos [6]. Além disso, a utilização de baixos volumes de amostra e a possibilidade de eliminar efeitos de matriz, permite a determinação destes compostos em matrizes complexas como sangue, urina, plasma, entre outros. Sendo assim, sua utilização permite a obtenção de informações que complementam os dados obtidos com as demais técnicas.

Além de metodologias eletroquímicas serem utilizadas com sucesso dispendo-se de eletrodos convencionais, a modificação de eletrodos de trabalho também ganha destaque tendo em vista que a alteração ou funcionalização da superfície eletródica pode promover maior interação com o analito alvo. A utilização de eletrodos modificados será abordada mais profundamente no Capítulo 4.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE CANDIDATOS NITROCOMPOSTOS A FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS

Fármacos tripanomicidas são utilizados na ação contra a doença de Chagas, ainda que também apresentem ação citotóxica ao indivíduo. A ação biológica destas moléculas se baseia, parcialmente, em processos de transferência de carga, os quais geram *in vivo* intermediários reativos responsáveis pela inibição do mecanismo de detoxificação natural do parasita. Este capítulo introduz a caracterização eletroquímica referente ao grupo nitro de novos candidatos a fármacos antichagásicos, cujo potencial de redução em meio aquoso permite avaliar a formação e estabilização do nitro ânion radical e, então, correlacionar com a atividade biológica prevista.

2.1 Introdução

2.1.1 Doença de Chagas

Doenças negligenciadas, por definição, são aquelas causadas por parasitas ou agentes infecciosos, consideradas endêmicas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, nos quais existe um claro desinteresse tanto na introdução quanto na otimização de novos fármacos para ação controladora [7]. Estas se enquadram em um grupo abrangente de endemias que, apesar de serem responsáveis por 11% da carga global de doenças, perpetuam-se como alvos negligenciáveis nas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos medicamentos, tendo em vista que apenas 1,15% dos 1556 novos fármacos, estes registrados entre 1975 e 2004, foram destinados em seu controle [8]. Este grupo de doenças afeta majoritariamente populações pobres do continente africano, asiático e americano, ainda que atualmente propagam-se devido à facilidade de migração populacional, modificando o perfil tradicional epidemiológico [9].

Dentre o grupo de endemias consideradas negligenciadas, a doença de Chagas se destaca, sendo essa uma doença tropical parasitária do continente americano, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e descoberta por Carlos Chagas em 1909 [10]. O mecanismo de transmissão do parasita é principalmente vetorial, através de insetos de hábitos noturnos da família Triatominae, pertencentes principalmente aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* [11], os quais afetam majoritariamente populações de baixa renda, suscetíveis a condições de saneamento básico precárias. Ainda assim, o mecanismo de transmissão oral, através de transfusões ou transplacentária também é possível. Febre, inchaço nos gânglios linfáticos, dor de cabeça e até mesmo, em estágios avançados da doença, insuficiência cardíaca, megaesôfago e megacólon, são sintomas característicos da doença de Chagas, que podem tardar de 10 a 30 anos para se manifestar [12]. No Brasil, a taxa de morbidade (número de pessoas que possuem a doença em relação ao número total

de pessoas avaliadas) e mortalidade (número de pessoas que morrem vitimadas pela doença em relação ao número total de pessoas avaliadas) é significativa, já que a doença proporciona um quadro de cardiopatia chagásica crônica evolutiva, vitimando até 20% ou mais dos indivíduos infectados [13].

Fármacos tripanomicidas como o benznidazol[®] e o nifurtimox[®], Figura 2.1, são empregados na ação controladora da doença de Chagas, atuando principalmente através da inibição de enzimas necessárias às exigências energéticas das células do parasita, ainda que também apresentem ação citotóxica ao indivíduo [14]. Estes fármacos apresentam-se eficientes no tratamento doença durante a fase aguda/intermediária, porém, perdem a eficácia se administrados tardiamente, apenas retardando ou prevenindo sintomas característicos da fase crônica [15]. Ainda que efetivos, o emprego destes medicamentos esteve atrelado, em 40% dos casos, a efeitos colaterais como doenças de pele, toxicidade cerebral e irritação do sistema digestivo [16].

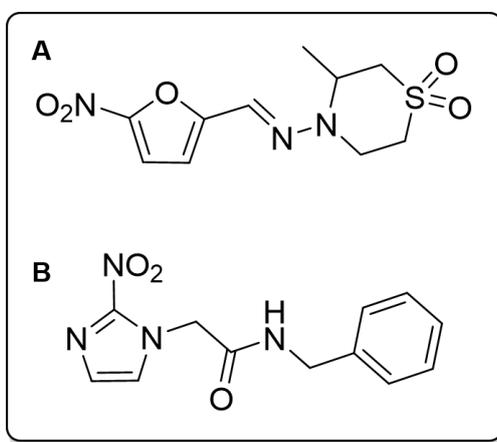


Figura 2.1. Estruturas moleculares dos fármacos (A) nifurtimox e (B) benznidazol.

2.1.2 Mecanismo de ação de nitrocompostos

De forma geral, uma das rotas na escolha de fármacos com atividade antichagásica se baseia na capacidade que possuem em influenciar o mecanismo de destoxificação do *Trypanosoma cruzi*, tornando-o deficiente no combate ao estresse oxidativo da célula [17].

O mecanismo de defesa do parasita é conduzido por uma enzima específica denominada tripanotiona redutase (TR), já que o parasita não possui as enzimas catalase, glutational peroxidase e glutational redutase, responsáveis por uma parcela do controle oxidativo em mamíferos [18]. Os fármacos atuam indiretamente na inibição da TR, dificultando a redução da tripanotiona dissulfeto (substrato fisiológico da enzima) ao seu componente tiólico, que por sua vez, é responsável pelo controle do estresse oxidativo no parasita [19]. Quando se inibe a ação da enzima de proteção tem-se, como consequência, o aumento da vulnerabilidade do parasita ao fármaco, promovida pelo aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular [20].

Tanto o benznidazol quanto o nifurtimox, fazem parte de uma classe de fármacos que possui um grupamento funcional nitro ($-\text{NO}_2$) atrelado, normalmente, a cadeias aromáticas. Sua citotoxicidade é vinculada à formação do nitro radical aniônico ($\text{R-NO}_2^{\bullet-}$), ao qual está associado o potencial de redução correspondente ao par $\text{R-NO}_2/\text{R-NO}_2^{\bullet-}$. O nitro radical aniônico e seus derivados (RNO, derivado nitroso e RNHOH, hidroxilamina) podem interagir toxicamente de duas formas: atuando diretamente como interferentes no metabolismo do oxigênio do parasita, ou interagindo diretamente com o DNA, ao desestabilizar a dupla hélice através de reações com as bases nitrogenadas (dependendo do pH, especificamente timina e adenina [17]), além de afetar, adicionalmente, lipídeos e proteínas [21].

A estabilidade dos intermediários oriundos da redução dos nitrocompostos (principalmente o nitro radical aniônico) define o grau de lesão, ou seja, quanto mais lenta a velocidade de decomposição e maior a facilidade em sua formação (ambos correlacionados ao seu potencial de redução), maiores e mais rápidas serão as lesões causadas [22].

Para a ação farmacológica, o composto bioativo primeiramente transpassa a membrana celular por difusão passiva e, sua concentração no meio intracelular aumenta, ao passo que espécies reativas provenientes da biorredução destes nitrocompostos desestabilizam a membrana. Na primeira etapa do processo de biorredução, o nitro radical aniônico é gerado, tanto em meio aprótico ou misto (aquoso/aprótico), em um processo eletroquímico reversível que envolve 1 elétron, conduzido por flavoenzimas em parasitas como o *Trypanosoma cruzi*.

Em condições anaeróbicas, a redução completa dos nitrocompostos envolve 6 elétrons, formando a amina através dos intermediários nitroso e hidroxilamínico, ainda que alguns desses fármacos não sejam reduzidos além da formação da hidroxilamina [23]. O nitro radical aniônico e a hidroxilamina são descritos como principais responsáveis pela toxicidade dos nitrocompostos, porém, os demais intermediários também apresentam relativa toxicidade, como por exemplo, o derivado nitroso, ao interagir com grupos tiólicos de enzimas detoxificantes, e o intermediário radical $R\text{-NO}_2^{\bullet} \text{H}^+$, ao reagir com as bases nitrogenadas do DNA [19]. A Figura 2.2 ilustra os intermediários reativos formados durante a redução do grupo nitro, bem como suas rotas de ação em meio aeróbico como anaeróbico.

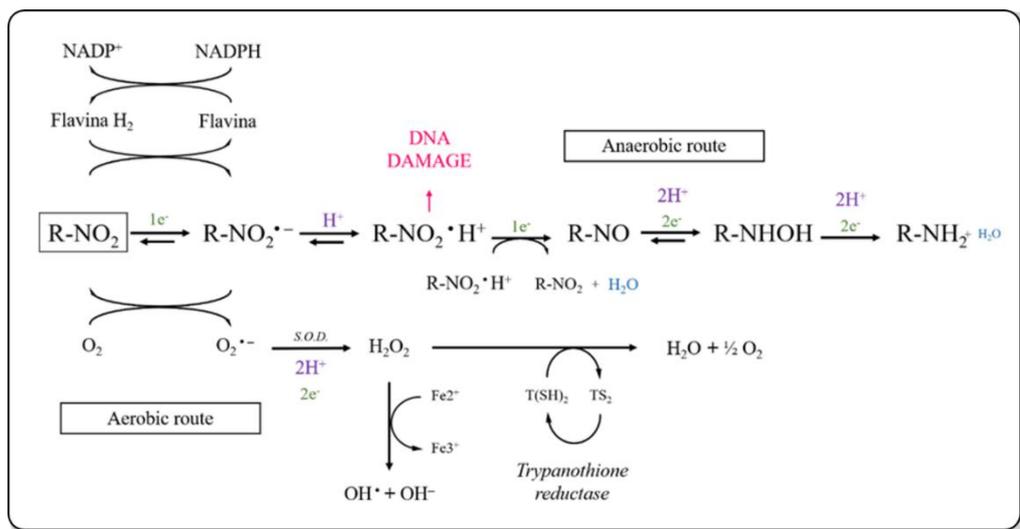


Figura 2.2. Intermediários reativos envolvidos na redução de nitrocompostos. Adaptado de [19].

Em condições aeróbicas, o nitro radical aniônico reage com o oxigênio, em uma etapa metabólica denominada ciclo fútil, regenerando o nitrocomposto inicial e gerando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) [18]. Este está envolvido em dois processos de desproporcionamento, tanto espontâneo, ou sob ação da enzima superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio, o qual tem a capacidade de introduzir radicais hidroxila (OH^{\bullet}) no meio intracelular. A Figura 2.2 apresenta o mecanismo dos intermediários de reação advindos da redução de nitrocompostos, tanto na presença quanto na ausência de oxigênio.

Sistemas enzimáticos apresentam capacidades distintas na redução do grupo nitro, no qual o processo de redução depende diretamente ao meio em que ocorre, tanto na ausência quanto na presença de oxigênio, fato este que pode ser correlacionado diretamente com a toxicidade seletiva dos nitrocompostos perante certos microrganismos. Em sistemas aeróbicos, os valores de potencial referentes ao par $R-NO_2/R-NO_2^{\bullet-}$ são da ordem de -0,35 V, diferentemente do observado em sistemas anaeróbicos, os quais podem chegar em valores de potencial da ordem de -0,5 V [23].

Os potenciais de redução destes compostos, obtidos via redução eletroquímica, têm sido utilizados para efetuar correlações entre os potenciais de redução e o mecanismo de ação biológica em aplicações biomédicas, no entanto, é preciso abordar a complexidade desses sistemas em relação à estereoquímica, difusão, solubilidade, permeabilidade na membrana, entre outros fatores. [24]. Ainda assim, dado que os processos fisiológicos mais importantes ocorrem por meio de reações de transferência de carga, processos induzidos por potencial em meios aquosos ou orgânicos podem ser usados para esclarecer processos redox e geração e estabilização de espécies intermediárias reativas e coletar mais evidências sobre reações biológicas de transferência eletrônica, sem o uso de métodos espectroscópicos e cromatográficos dispendiosos [15]. Uma variedade de nitrocompostos aromáticos já foi caracterizada eletroquimicamente (como nitrobenzenos, nitrofuranos e nitroimidazóis), no

entanto, quase toda a avaliação de intermediários reativos foi realizada em meios apróticos ou orgânicos [23,25–27], a fim de estabilizar ainda mais os radicais formados e prever seu mecanismo e potencial de redução [25,28–36]. Além disso, estes processos de redução também foram avaliados em diferentes materiais de eletrodos, como mercúrio [37], carbono [38], diamante dopado com boro [39,40] e eletrodos modificados [41], a fim de estabilizar uma conexão entre a composição do transdutor e a estabilização de intermediários reativos. Ainda assim, os principais aspectos relacionados ao estudo eletroquímico dessas classes de compostos são a eficiência biológica [26,32,42–44] e o potencial dano ao DNA do microrganismo [45–54].

2.1.3 Candidatos antichagásicos

Os compostos utilizados nesta tese foram fornecidos pela Prof.^a Dr.^a Elizabeth Igne Ferreira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), Figura 2.3. Ambos são isômeros de posição, e foram desenvolvidos através de modelagens moleculares em busca de novos candidatos a fármacos com potencial antichagásico e antibacteriano, com menor toxicidade.

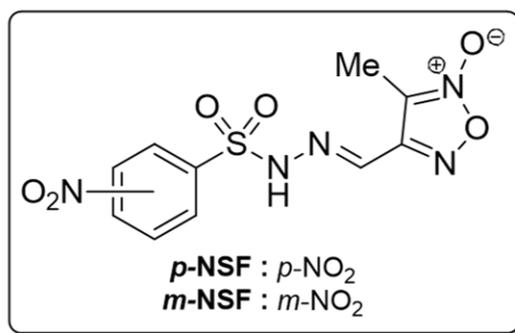


Figura 2.3. Estruturas dos compostos *p*-NSF (2-Óxido de (*E*)-3-metil-4-((2-((*para*-nitrofenil)sulfonyl)hidrazono)metil)-1,2,5-oxodiazol) e *m*-NSF (2-Óxido de (*E*)-3-metil-4-((2-((*meta*-nitrofenil)sulfonyl)hidrazono)metil)-1,2,5-oxodiazol) em estudo.

2.1.3.1 Ação bacteriana

A atividade antibacteriana destes compostos está atrelada à inibição da FabH (β -*ketoacylcarrierproteinsynthase*), enzima presente em bactérias, responsável por promover a síntese de ácidos graxos (FAS), através da condensação de malonil-ACP com 2-metilbutirila-CoA ou com acetil-CoA. A ação antibacteriana do composto é atribuída ao grupo sulfonildrazona, como resultado de interações com a enzima FabH. Já o anel furoxano, fornece à molécula carácter iônico (densidade de carga negativa) e promove interações iônicas com receptores ou sítios ativos da enzima. Como o mecanismo de FAS é diferente em bactérias e seres humanos, é possível constatar a seletividade dos compostos desenvolvidos quando empregados como fármacos [55].

2.1.3.2 Ação antichagásica

O planejamento estrutural desta classe de fármacos antichagásicos foi desenvolvida através da presença de três porções distintas: o anel aromático que contém o grupo nitro, a porção sulfonilidrazônica intermediária e o anel furoxano, os quais promovem a geração de espécies reativas no meio intracelular, inibição de cisteíno proteases e liberação de óxido nítrico, respectivamente.

2.1.3.2.1 Geração de espécies reativas

A presença do grupo funcional nitro ($R-NO_2$) no anel benzênico dos compostos, tanto na posição *-para* quanto na posição *-meta*, promove o aumento de intermediários reativos advindos do processo de biorredução no meio intracelular. O mecanismo de ação do grupo nitro e a consequente inibição indireta da tripanotona redutase já foram discutidos na Seção 2.1.2.

2.1.3.2.2 Inibição de cisteíno proteases

A endoprotease em questão (cruzaína) é capaz de hidrolisar diversos tipos de proteínas vitais para o processo de nutrição do parasita, além de estar também envolvida na penetração

da forma tripomastigota na célula mamífera e no processo de escape do parasita contra o mecanismo imunológico do hospedeiro. O grupo acilidrazônico atua diretamente no sítio ativo da enzima, promovendo, assim, sua inibição. A substituição desta porção da molécula pelo grupo sulfonildrazônico, representado na Figura 2.4, promove um aumento na atividade tripanomicida em relação ao seu bioisómero (derivado acilidrazônico), e também um aumento na seletividade em comparação ao fármaco atualmente empregado (benznidazol), quando na ausência do grupamento nitro [56].

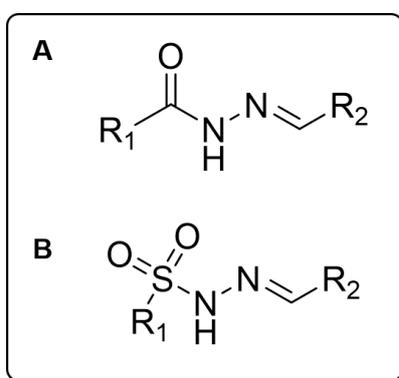


Figura 2.4. Estruturas moleculares do derivado acilidrazônico (1) e sulfonildrazônico (2).

2.1.3.2.3 Liberação de óxido nítrico

No meio intracelular, a presença de óxido nítrico auxilia a ruptura da membrana plasmática do agente etiológico, ainda que sua liberação excessiva possa prejudicar também as células hospedeiras [55,57]. A liberação de óxido nítrico ocorre em meio alcalino, no qual o anel furoxano sofre hidrólise, segundo o mecanismo ilustrado na Figura 2.5.

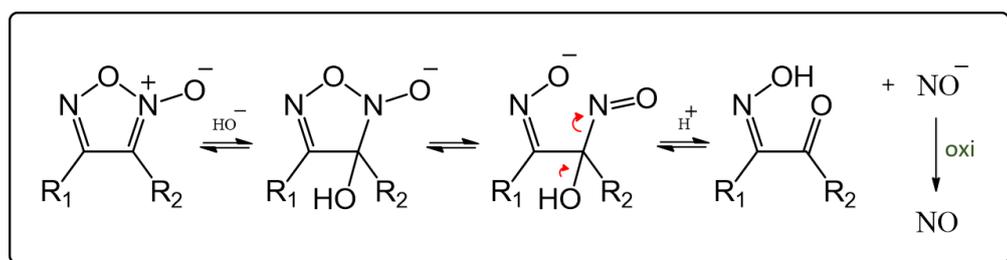


Figura 2.5. Mecanismo de liberação de óxido nítrico. Adaptado de [55].

Dentro dos demais itens, os mecanismos de redução eletroquímica do *p*-NSF e *m*-NSF, compostos líderes a medicamentos contra a doença de Chagas, foram investigados na presença e ausência de oxigênio. A caracterização da redução eletroquímica do grupo nitro nestes compostos foi avaliada em meio preponderantemente aquoso e com eletrodo de carbono vítreo sem modificação, meio não usual para a determinação de seus intermediários reativos. Ainda que a determinação do processo de redução monoelétrica possa ser dificilmente distinguido sem a utilização de uma superfície eletródica que o estabilize, as informações obtidas podem ainda assim ser correlacionadas com a atividade biológica prevista. Dado que moléculas que apresentam grupos tiol em sua estrutura podem formar adutos com alguns dos intermediários reativos, esta eventual interação também foi avaliada. A correlação entre os valores de potencial de redução, a presença de produtos de redução estabilizados e a comparação com compostos similares (derivados acilidrazônicos) já com atividade biológica determinada (em ensaios *in vivo*) foi realizada com a finalidade de prever a correlação entre a diferença de posição do grupo nitro no anel benzênico (posição para ou meta) e a atividade biológica prevista.

2.2 Objetivos

- Investigar o mecanismo de redução dos compostos *p*-NSF e *m*-NSF, os quais são candidatos a fármacos antichagásicos, sintetizados pelo aluno de doutorado Ricardo Serafim, sob a supervisão da Prof.^a Dr.^a Elizabeth Igne Ferreira (FCF-USP).
- Obter o perfil voltamétrico de intermediários eletroativos sintetizados pelo aluno de doutorado Kevin Dias, sob a supervisão do Prof. Dr. Leandro H. Andrade, a fim de estabelecer comparações com os processos eletroquímicos observados pelos compostos candidatos a fármacos antichagásicos descritos no projeto

- Discriminar os processos de redução dos compostos tendo em vista a formação de intermediários reativos como o nitro ânion radical e avaliar sua interação com moléculas aceptoras de elétrons, como oxigênio e cisteína;
- Prever a atividade biológica através da correlação entre o potencial de redução para o grupo nitro de ambos os compostos e comparar com o observado para nitrocompostos derivados acilidrazônicos já descritos na literatura e cuja atividade biológica já foi comprovada por ensaios *in vivo* [58].

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sem prévia purificação. As soluções foram preparadas com água deionizada (18 M Ω cm) obtida com sistema de osmose reversa OS10 LX (Gehaka).

2.3.2 Preparo de soluções

As soluções de eletrólito utilizadas nas medidas com eletrodo de carbono vítreo limpo em meio aquoso (solução tampão Britto-Robinson (BR) 0,04 M) foram preparadas a partir da dissolução de massa apropriada de borato de sódio (Na₂B₄O₇) e diluição do volume apropriado de ácido fosfórico (H₃PO₄) e ácido acético (CH₃COOH) em água deionizada. O ajuste do pH das soluções de eletrólito suporte foi realizado com adições de pequeno volume de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6,0 M para valores de pH entre 4,0 e 10 (solução tampão BR 0,04 M).

As soluções estoques 5,0 e 25,0 mM de *p*-NSF, *m*-NSF, *p*-MS e nitrobenzeno foram preparadas por dissolução de massa/volume apropriada dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) e foram mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente (25 °C) por até 3 dias.

A solução estoque 10 mM de cisteína foi preparada previamente às medidas realizadas por dissolução de massa apropriada do composto em água deionizada.

2.3.3 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram efetuadas utilizando um potenciostato/ galvanostato Autolab PGSTAT 101 da Metrohm controlado pelo software NOVA versão 1.11.2. As medidas de pH foram efetuadas usando um pHmetro modelo 654 acoplado a um eletrodo de vidro combinado modelo 6.0203.100 (OE), ambos da Metrohm.

2.3.4 Célula eletroquímica e sistema de eletrodos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica constituída de um copo de vidro com capacidade volumétrica de 10 mL. Foi utilizado um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo (GCE, área geométrica = 0,071 cm²). O eletrodo de Ag/AgCl, KCl_(sat) e um fio de platina foram utilizados como eletrodo de referência e auxiliar, respectivamente.

2.3.4.1 Polimento e limpeza do eletrodo de carbono vítreo

A superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi renovada mecanicamente com polimento utilizando spray de diamante com tamanho de partícula de 1,0 µm (Kemet) como material abrasivo em um feltro (Buehler, TexMet C) e posteriormente lavada com água deionizada. O eletrodo foi lavado com água deionizada e etanol após cada etapa de polimento mecânico. O procedimento de renovação da superfície do eletrodo foi realizado antes de cada medida eletroquímica.

2.3.5 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram efetuadas com o eletrodo de carbono vítreo não modificado, em solução de eletrólito (solução tampão BR 0,04 M) contendo 1,0 mM de

analito: à célula eletroquímica contendo 2,5 mL do eletrólito adicionaram-se 100 µL da solução estoque (25 mM), de modo a obter a concentração de 1,0 mM em célula.

Em voltametria cíclica, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 2 mV de degrau de potencial e 100 mVs⁻¹ de velocidade de varredura, a menos que indicado o contrário.

Em voltametria de pulso diferencial, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 25 mV de amplitude de pulso, 0,5 s de tempo de intervalo entre pulsos, 0,05 s de tempo de modulação e 5 mV de degrau de potencial, resultando em 10 mVs⁻¹ como velocidade de varredura, a menos que indicado o contrário. Em voltametria de onda quadrada, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 25 mV de amplitude de pulso, 3 mV de degrau de potencial, 33 Hz de frequência, resultando em 10 mVs⁻¹ como velocidade de varredura.

As medidas eletroquímicas foram em sua maioria realizadas na ausência de oxigênio através do borbulhamento de gás nitrogênio por 15 min previamente ao registro dos voltamogramas. Para as medidas realizadas na presença de oxigênio, o procedimento anterior foi repetido e seguido de borbulhamento de oxigênio à uma vazão de 1 L/min pelo tempo indicado.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Caracterização voltamétrica dos compostos *p*-NSF e *m*-NSF

A fim de obter uma visão geral do perfil eletroquímico de ambos os compostos, voltamogramas cíclicos foram registrados com GCE em uma ampla faixa de potencial ($E_i = 0,0$ V, $E_{\lambda 1} = -1,4$ V, $E_{\lambda 2} = 1,0$ V, $E_f = 0,0$ V), em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 (meio predominantemente aquoso) contendo 1,0 mM de *p*-NSF e *m*-NSF, na ausência de O₂, Figura

2.7A e Figura 2.7B. Os potenciais de pico referentes aos processos observados para os compostos se encontram na Tabela 2.1. O perfil eletroquímico observado para ambos os compostos foi o mesmo considerando o número de processos de redução e oxidação e seu valor de potencial, provavelmente devido à semelhança estrutural de ambas as moléculas. Tendo em vista a quantidade de grupos eletroativos presentes nos dois compostos e o número de processos eletroquímicos distintos visualizados nos voltamogramas cíclicos, dois compostos estruturalmente semelhantes foram utilizados (nitrobenzeno e *p*-MS, Figura 2.6) a fim de elucidar a redução do grupo nitro e distinguir processos que pudessem interferir ou se sobrepor a eles.

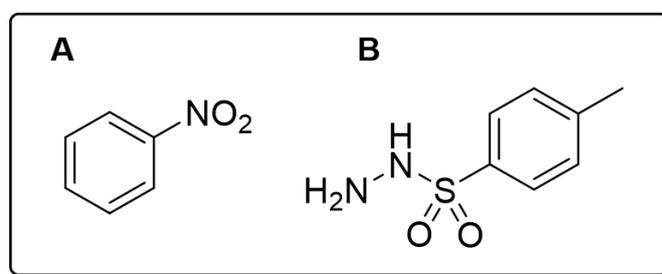
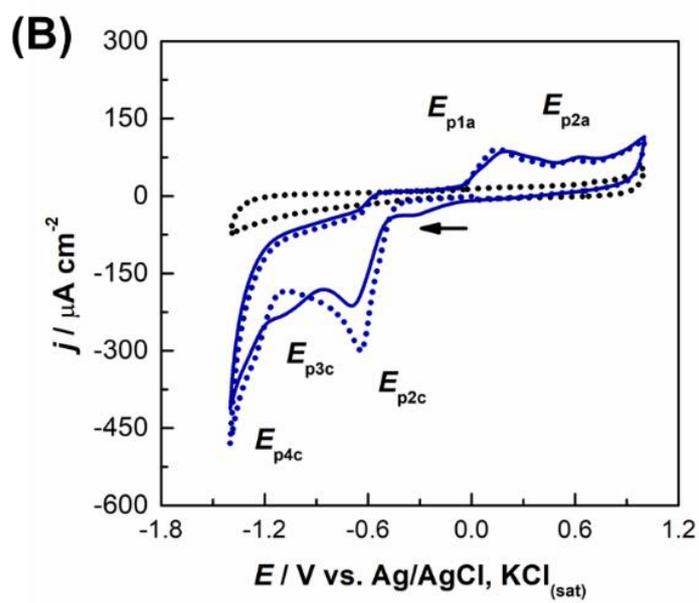
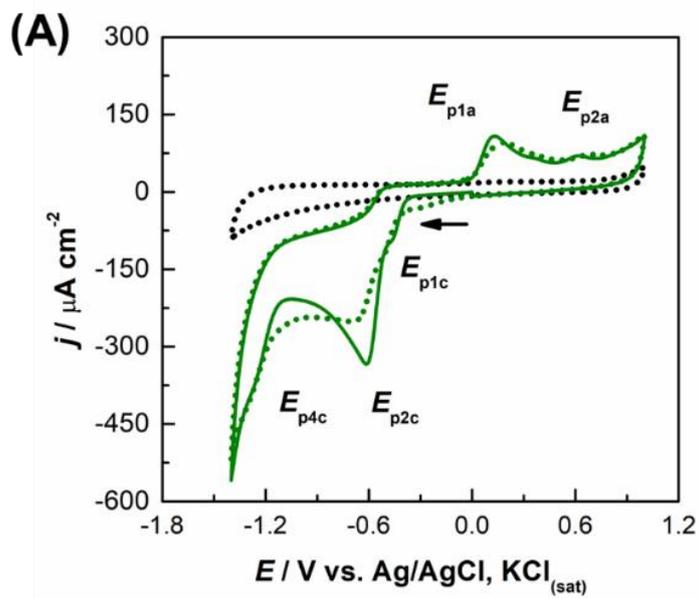


Figura 2.6. Estruturas moleculares do nitrobenzeno (A) e *p*-MS (B).

No sentido direto de varredura de potencial (sentido negativo), um processo principal de redução pode ser observado para ambos os compostos, processo **2c**, $E_{p2c} (p\text{-NSF}) = -0,61 \text{ V}$ e $E_{p2c} (m\text{-NSF}) = -0,64 \text{ V}$. Os valores de potencial para estes processo de redução em ambos os compostos foram comparados com os resultados dos voltamogramas cíclicos obtidos nas mesmas condições, porém na presença de 1,0 mM de nitrobenzeno, Figura 2.7C. Os resultados indicam que o processo **2c** e **1a** correspondem à redução do nitro grupo ligado ao anel benzeno e a posterior oxidação de um de seus intermediários, respectivamente, como também observado para outros nitrocompostos já caracterizados em meio aquoso [28]. A redução do grupo nitro geralmente é registrada em torno de -0,4 V a -0,7 V e essa mudança nos valores de potencial geralmente está associada à sua posição e a estrutura aromática a

ele anexada (geralmente um anel furânico, anel imidazólico e anel benzênico), já que que as variações estruturais afetam a estabilidade dos produtos de redução [23].



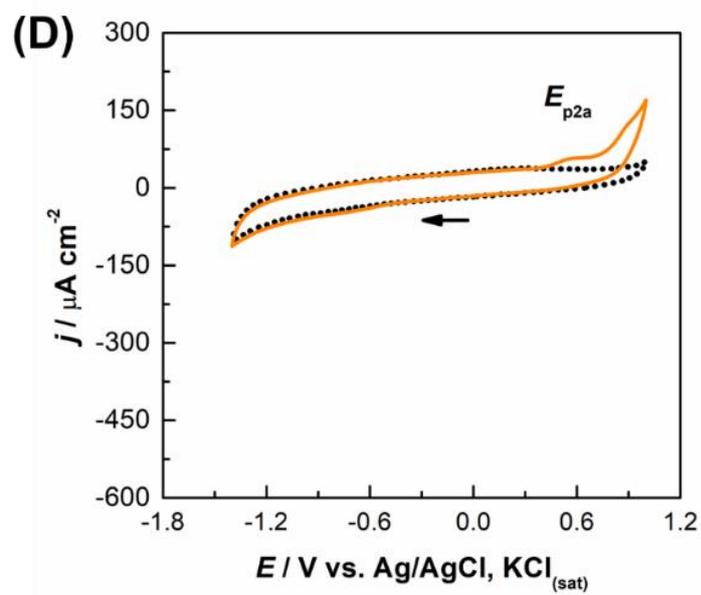
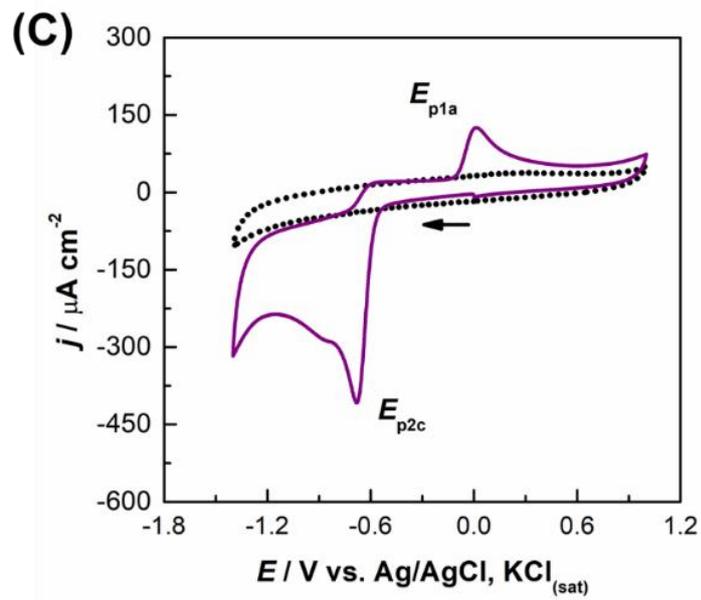


Figura 2.7. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 1,0 mM de *p*-NSF (A), *m*-NSF (B), nitrobenzeno (C) e *p*-MS (D) na ausência de oxigênio, branco (●●●), 1º ciclo (linha sólida) e 2º ciclo (linha pontilhada).

Tabela 2.1. Potenciais de pico para os processos observados nos voltamogramas cíclicos obtidos em meio preponderantemente aquoso contendo *m*-NSF e *p*-NSF (1° ciclo).

<i>p</i> -NSF				<i>m</i> -NSF			
Processo	E_p / V	Processo	E_p / V	Processo	E_p / V	Processo	E_p / V
1c	-0,451	1a	0,125	1c	ausente	1a	0,141
2c	-0,610	2a	0,618	2c	-0,644	2a	0,585
4c	-1,25			3c	-1,05		
				4c	-1,26		

O material do eletrodo pode auxiliar na separação de um processo eletroquímico em dois ou mais componentes, e, neste caso, mudanças nos potenciais de redução ou oxidação para intermediários reativos pode ser observada. Usualmente, a caracterização eletroquímica de nitrocompostos é conduzida em eletrodos de carbono (carbono vítreo, pasta de carbono, diamante dopado com boro) tendo em vista sua compatibilidade química com estruturas aromáticas.

Para ambos os compostos (*p*-NSF e *m*-NSF), uma variação nos potenciais de pico e uma diminuição das magnitudes de corrente foram observadas no segundo ciclo registrado, o que pode ser um indicativo de que as espécies eletroquimicamente geradas no primeiro ciclo, podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo e interferem nas reações de transferência de carga observadas nos ciclos subsequentes.

O processo **2a** está presente nos voltamogramas cíclicos para ambos os compostos, no entanto, não está presente nas medidas obtidas na presença de nitrobenzeno, o que sugere que este processo possa estar atrelado a outras porções estruturais presentes nos candidatos *p*-NSF e *m*-NSF. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE em tampão BR 0,04 M, pH 7,0, na presença do *p*-MS, mostram o processo **2a**, Figura 2.7D. Sendo assim, esse processo pôde ser atribuído, então, à porção intermediária dos compostos, possivelmente à oxidação do heteroátomo do grupo enamida próximo ao grupo sulfona. De fato, foi relatado que o valor potencial para essa oxidação está próximo ao processo **2a** [59].

De acordo com o mecanismo de redução para o grupo nitro indicado anteriormente, Seção 2.1.2. era esperado que seus intermediários de redução não pudessem ser distintamente detectados devido à possibilidade de reações químicas acopladas com água (dado sua instabilidade e natureza aquosa do eletrólito). Ainda assim, observou-se que o composto *p*-NSF possuía um processo de redução a mais do que o observado para o composto *m*-NSF, nomeadamente, o processo de redução **1c**, ao passo que todos os demais processos, apesar de apresentarem valor de potencial de pico distintos, possivelmente representassem as mesmas reações de oxidação ou redução em ambos os compostos. O potencial de pico do processo **1c** e sua ausência nas medidas registradas para o candidato *m*-NSF indicam que este processo pode estar relacionado à redução e formação de um desses intermediários reativos. Como a atividade biológica de ambos os candidatos pode ser correlacionada com a presença e a estabilidade dos intermediários reativos do grupo nitro, os voltamogramas no sentido negativo de potencial foram escolhidos como foco do estudo.

Além da voltametria cíclica, resultados relevantes também podem ser obtidos por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, já que ambas apresentam maior sensibilidade. O primeiro, realizado em uma velocidade baixa de varredura, fornece uma estimativa do número de elétrons envolvidos em cada processo eletroquímico, um passo importante para entender os mecanismos de reação de transferência de elétrons, enquanto o último permite avaliar a reversibilidade dos processos em velocidades de varredura mais altas sem perder a sensibilidade.

Voltamogramas de pulso diferenciais foram obtidos com GCE em solução tampão BR 0,04 M em diferentes valores de pH em uma faixa de 4,0 a 10 contendo 1,0 mM de *p*-NSF na ausência de oxigênio. As Figuras 2.8A, 2.8B e 2.8C ilustram os voltamogramas de pulso diferencial em pH 4,0, 7,0 e 10, respectivamente. O processo de redução **3c** ocorre apenas em valores mais altos de pH (pH > 8,0) e o processo **4c** ocorre apenas em valores mais baixos

de pH ($\text{pH} < 7,0$). No entanto, o processo **2c** ocorre em uma ampla faixa de valores de pH, mesmo que em valores mais altos, um ombro de redução seja perceptível (processo **1c**), Figura 2.8B. Os valores de potencial observados na ampla faixa de pH utilizada estão ilustrados no gráfico E_p vs. pH, Figura 2.8D, no qual um deslocamento no potencial de pico para os processos é observado.

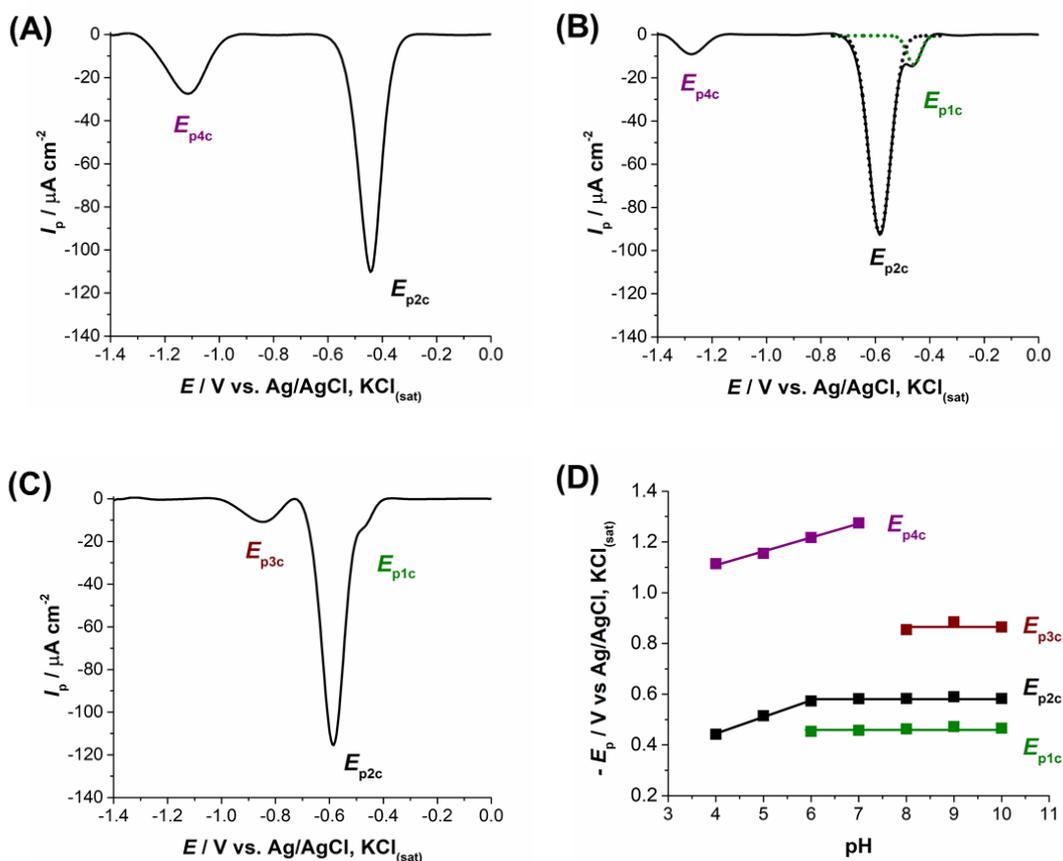


Figura 2.8. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em GCE em tampão BR 0,04 M pH 4,0 (A), 7,0 (B) e 10 (C) contendo 1,0 mM de *p*-NSF, na ausência de oxigênio. Gráfico E_p vs pH obtido a partir dos voltamogramas de pulso diferencial (D).

Em valores mais baixos de pH ($4,0 < \text{pH} < 6,0$), o potencial de pico do processo **2c** varia para valores mais negativos, de acordo com a equação (2.1),

$$E_{p2c}(\textit{p}\text{-NFS}) / \text{mV} = -0.185 - 0.065 \text{ pH} \quad (R^2 = 0.991) \quad (2.1)$$

em que a inclinação da curva indica que o número de prótons e elétrons envolvidos nesse processo é o mesmo, próximo ao valor teórico de 59 mV/pH, Seção 1.2 do Capítulo 1. Em valores de pH superiores a 6,0, o potencial de pico E_{p2c} permanece constante e, possivelmente, é formado um produto de redução diferente sem o envolvimento de prótons. Além disso, em valores de pH iguais ou maiores que 6,0, discrimina-se um novo processo de redução (processo **1c**). O valor potencial de pico desse processo também permanece constante na faixa de pH avaliada, o que indica que não há envolvimento de prótons, bem como para o processo **4c** em valores mais altos de pH ($\text{pH} > 7,0$). Entretanto, em valores mais baixos de pH ($4,0 < \text{pH} < 7,0$), o processo **4c** sofre uma mudança nos potenciais de pico, o que ilustra que este processo de redução é facilitado em meio ácido, de acordo com a equação (2.2),

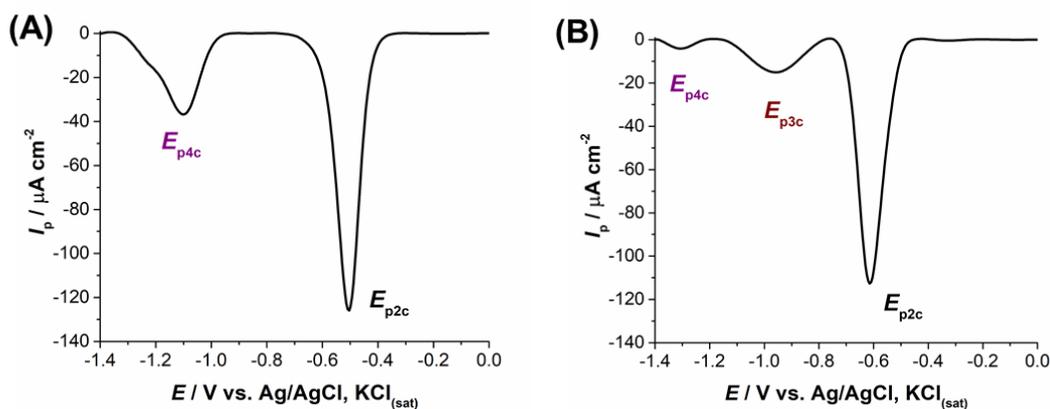
$$E_{p4c}(p\text{-NFS}) / \text{mV} = -0.890 - 0.055 \text{ pH} \quad (R^2 = 0.990) \quad (2.2)$$

em que a inclinação da curva também indica que o número de prótons é igual ao número de elétrons transferidos, semelhante ao observado em valores mais baixos de pH para o processo **2c**. O processo **3c** não sofre nenhuma alteração nos potenciais de pico na ampla faixa de pH estudada.

Os valores de potencial à meia altura de corrente ($W_{1/2}$) obtidos a partir de dados obtidos em voltamogramas de pulso diferencial em tampão BR 0,04 M pH 7,0 correspondem a -72 e -96 mV para os processos **1c** e **2c**, respectivamente. Dentro da margem de erro, esses valores indicam que esse processo de redução ocorre com a transferência de um elétron, dada a correlação de 90 mV por elétron transferido, Seção 1.2 do Capítulo 1. Os processos **3c** e **4c** apresentam um valor mais alto de $W_{1/2}$, os quais podem apresentar baixa velocidade de transferência de carga ou ainda a sobreposição de dois processos de redução.

Nos voltamogramas de pulso diferencial registrados após a primeira medida, sem renovação da superfície eletródica (dados não ilustrados), os processos apresentaram a mesma magnitude de corrente e potencial de pico que as primeiras medidas realizadas. Neste caso, tendo em vista que estas medidas foram conduzidas somente no sentido negativo de varredura de potencial, é possível inferir que nenhum produto de redução formado na primeira medida interfere com a transferência de carga na segunda medida. Porém, isto difere do observado nos voltamogramas cíclicos, Figura 2.7A e 2.7B, nos quais o deslocamento do potencial de pico e a diminuição da magnitude de corrente ocorrem no segundo ciclo registrado. Pode-se, então, inferir que a diminuição de correntes catódicas e variação dos potenciais de redução possa estar associada à passivação superficial do eletrodo, tendo em vista que neste caso, a varredura de potencial atingiu valores positivos.

Voltamogramas de pulso diferencial também foram registrados com GCE em tampão BR 0,04 M em diferentes valores de pH em uma faixa de 4,0 a 10 contendo 1,0 mM de *m*-NSF, na ausência de oxigênio. As Figuras 2.9A, 2.9B e 2.9C ilustram os voltamogramas de pulso diferencial em pH 4,0, 7,0 e 10, respectivamente.



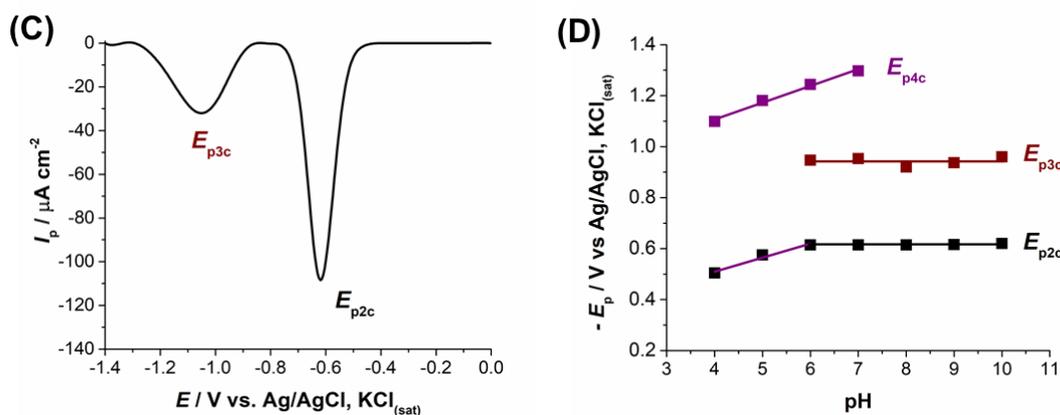


Figura 2.9. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em GCE em tampão BR 0,04 M pH 4,0 (A), 7,0 (B) e 10 (C) contendo 1,0 mM de *m*-NSF, na ausência de oxigênio. Gráfico E_p vs pH obtido a partir dos voltamogramas de pulso diferencial (D).

Os principais processos de redução (**2c** e **4c**) observados para *p*-NSF estão presentes, no entanto, mesmo em valores mais altos de pH ($\text{pH} > 6,0$), o processo **1c** não pôde ser distinguido, Figura 2.9B. O processo **3c** estava presente em valores mais baixos de pH do que os observados com *p*-NSF, embora ainda apenas seja perceptível em valores intermediários e mais altos de pH ($\text{pH} > 7,0$).

O gráfico E_p vs. pH, Figura 2.8D, indica uma similaridade em relação aos processos de redução que as moléculas compartilham, **2c**, **3c** e **4c**. Os processos **2c** e **4c** sofrem um deslocamento nos potenciais de pico de acordo com as equações (2.3) e (2.4),

$$E_{p2c}(m\text{-NFS}) / \text{mV} = -0.2890 - 0.056 \text{ pH} \quad (R^2 = 0.945) \quad (2.3)$$

$$E_{p4c}(m\text{-NFS}) / \text{mV} = -0.8438 - 0.065 \text{ pH} \quad (R^2 = 0.985) \quad (2.4)$$

Sendo assim, a discussão relativa ao envolvimento de prótons e elétrons é igual ao previamente discutido para o composto *p*-NSF. O processo **3c** não sofre alteração nos valores de potencial de pico, semelhante ao observado nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos com *p*-NSF. A aproximação do número de elétrons envolvidos no processo de redução não foi realizada, uma vez que os valores $W_{1/2}$ indicaram que mais de um processo de redução poderiam estar sobrepostos.

Tabela 2.2. Diferenças entre os potenciais de pico E_{p1c} e E_{p2c} obtidos em voltametria de pulso diferencial com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão 0,04 M BR pH 7,0 para os compostos p -NSF e m -NSF.

Composto	E_{p1c} / V	E_{p2c} / V
p -NSF	-0,457	-0,583
m -NSF	ausente	-0,615

Embora exista uma similaridade entre as duas moléculas em termos do perfil eletroquímico em relação aos processos de redução e sua magnitude de corrente em uma ampla faixa de pH, o composto p -NSF sofre outro processo de redução (**1c**), $E_{p1c} (p\text{-NSF}) = -0,457 V$ em tampão BR 0,04 M, pH 7,0, e também, o processo de redução **2c** ocorre em valores menos potenciais do que aquele observado para o composto m -NSF.

O processo de redução **2c**, $E_{p2c} (m\text{-NSF}) = -0,615 V$ ocorre em valor de potencial mais negativo do que aquele observado para o composto p -NSF, $E_{p2c} (p\text{-NSF}) = -0,583 V$. A mudança nos potenciais de pico (menor energia para promover a redução do composto p -NSF) e a presença de outro processo de redução (produto intermediário mais estável), novamente, podem estar associados à diferença na posição do grupo nitro na estrutura aromática, como ilustrado na Figura 2.10, o que mostra como seria o fluxo eletrônico envolvido na formação do nitro ânion radical ($RNO_2^{\bullet-}$) proveniente da redução monoelétrica dos composto p -NSF e m -NSF.

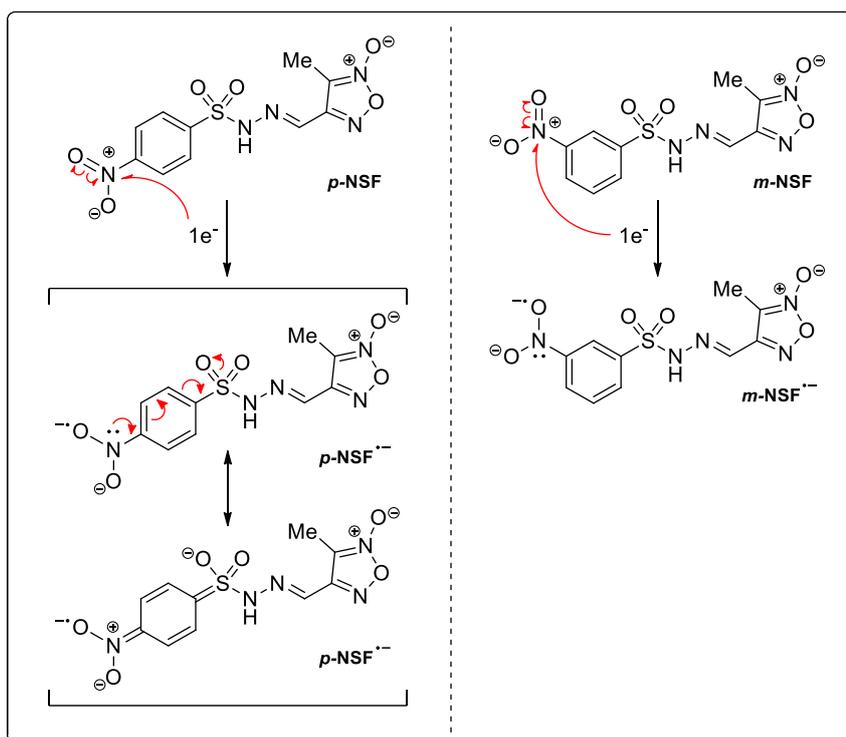


Figura 2.10. Cânones de ressonância do nitro ânion radical formado pela redução monoelétrica dos compostos *p*-NSF e *m*-NSF.

Como primeiro passo, ocorre a redução monoelétrica dos compostos *p*-NSF e *m*-NSF, induzindo a homólise da ligação π entre o nitrogênio e o oxigênio presente na porção nitro, gerando os nitro radicais aniônicos *p*-NSF $^{\bullet-}$ e *m*-NSF $^{\bullet-}$ [60]. Em termos estruturais, o intermediário *p*-NSF $^{\bullet-}$ possui a capacidade de ser estabilizado pela ressonância do par solitário alocado no nitrogênio, interrompendo a aromaticidade do anel benzênico e a dupla ligação entre o enxofre e o oxigênio na porção sulfonila. Assim, a presença de estruturas de ressonância do *p*-NSF $^{\bullet-}$ poderia aumentar consideravelmente sua vida útil durante as medidas eletroquímicas.

Com a finalidade de avaliar a reversibilidade dos produtos de redução gerados, voltamogramas de onda quadrada também foram registrados com GCE em tampão BR 0,04 M com diferentes valores de pH (4,0, 7,0 e 10) contendo 1,0 mM de *p*-NSF e *m*-NSF, na ausência de oxigênio, Figura 2.11(A-C) e Figura 2.11(D-F), respectivamente.

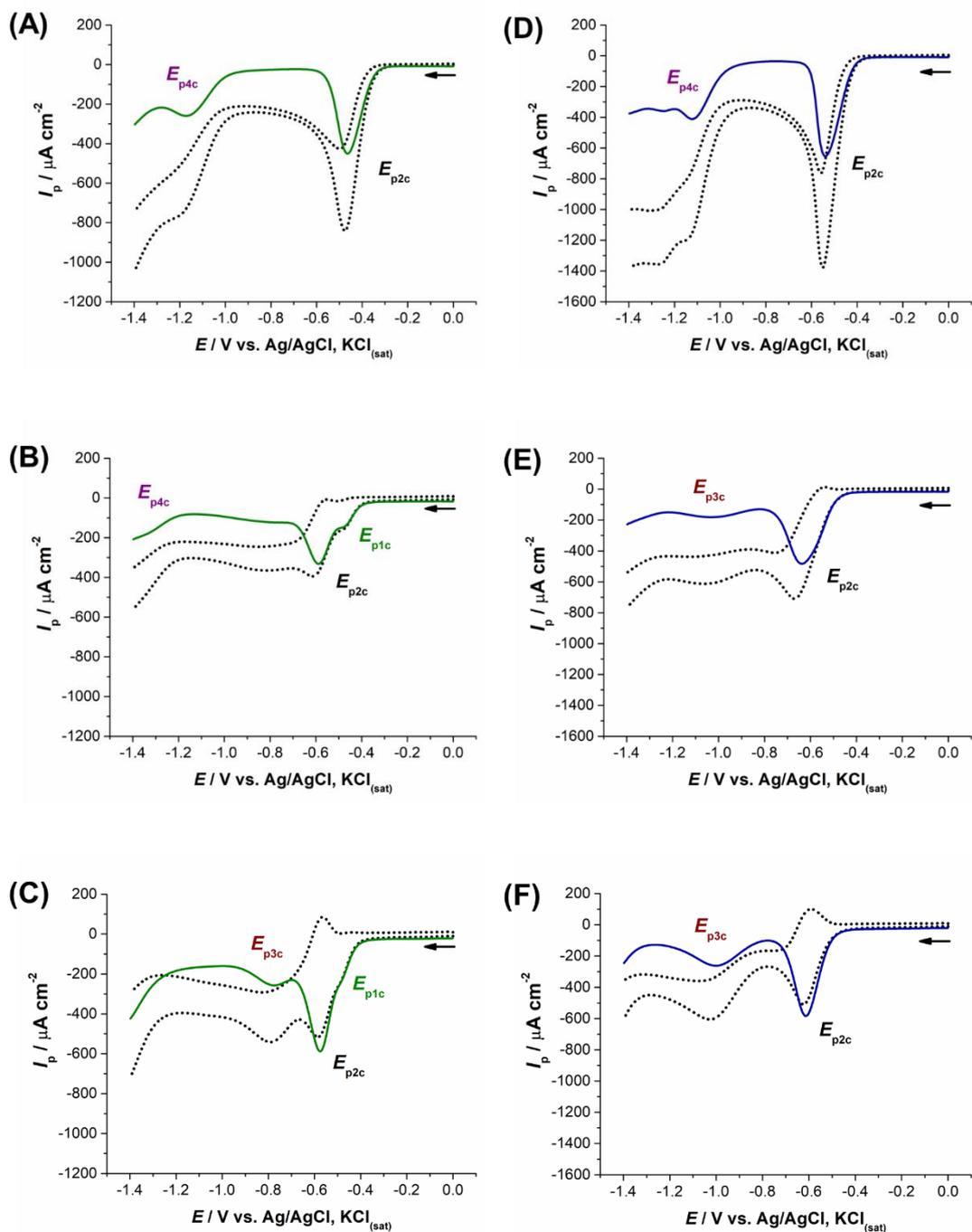


Figura 2.11. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em GCE em tampão BR 0,04 M pH 4,0 (A,D), 7,0 (B,E) e 10 (C,F) contendo 1,0 mM de $p\text{-NSF}$ (A-C) e 1,0 mM de $m\text{-NSF}$ (D-F), na ausência de oxigênio.

Esses dados indicam que o processo $2c$ é irreversível em pH 4,0 para o $p\text{-NSF}$ e $m\text{-NSF}$, dado que a corrente inversa (I_b) não apresenta componente anódica. Com o aumento do valor do pH para 7,0 ou pH 10, a reversibilidade do processo $2c$ é observada, tendo em

vista a presença da componente anódica e, com valores de I_f/I_b próximos de 1 em meio alcalino. Novamente, o processo **1c** é registrado apenas nas medições realizadas para *p*-NSF, e componente anódica correspondente também aumenta com o aumento do valor do pH do meio. Os processos **3c** e **4c** não apresentam indícios de reversibilidade em nenhum dos valores de pH avaliados.

Dadas as diferenças acima mencionadas na caracterização eletroquímica de ambos os compostos quanto aos processos de redução **1c** e **2c**, é necessário compreender o mecanismo de redução referente a estes processos a fim de estabelecer uma previsão para a atividade biológica dos compostos candidatos a antichagásicos. O processo **2c** pode ser atribuído à redução direta do grupo nitro na formação de hidroxilamina, de acordo com a reação (R1),



$4.0 < \text{pH} < 6.0$

Neste caso o processo de redução ocorre em valores mais baixos de pH com o envolvimento de 4 elétrons e 4 prótons, sendo este processo favorecido pela disponibilidade de prótons no meio, e confirmado pelos voltamogramas de pulso diferencial obtidos anteriormente (alto valor de $W_{1/2}$ e deslocamento do potencial de pico). Além disso, a irreversibilidade desse processo de redução foi confirmada em voltamogramas de onda quadrada, nos quais em valores mais baixos de pH (pH = 4,0), a corrente inversa não apresentava um componente anódico.

Por outro lado, a redução de nitrocompostos em valores intermediários e altos de pH (pH = 7,0 e pH = 10) favorece a estabilização de intermediários reativos como o nitro ânion radical e o derivado nitroso, o que diminui drasticamente a redução posterior para a formação da hidroxilamina. Dado que a disponibilidade de prótons diminui, a formação do derivado nitroso é favorecida, de acordo com a reação (R2),



$$7,0 < \text{pH} < 10$$

em que dois elétrons e um próton estão envolvidos. A inclinação do gráfico E_p vs. pH para ambos os compostos não indica que haja um envolvimento de prótons nesse processo de redução. A formação de derivado nitroso pode seguir 2 rotas diferentes: redução do nitro ânion radical, de acordo com a reação (R3) e redução direta do nitrocompostos original a RNO, de acordo com a reação (R2), mas em ambos os casos, o processo é pH dependente.



$$7,0 < \text{pH} < 10$$

Usualmente, a formação do derivado nitroso advém diretamente do nitro ânion radical, mas, tendo em vista que este, em meio aquoso, é dificilmente registrado, é possível que a estimativa do número de elétrons envolvidos através de valores de $W_{1/2}$ seja uma aproximação não muito correta. De fato, o valor estimado é de 1 elétron para o processo E_{p2c} . É possível que a formação do derivado nitroso, ainda que apresente envolvimento de prótons, ocorra com etapas determinantes que não são facilmente observadas na via eletroquímica. Sendo assim, a hipótese que mais convém de acordo com os dados voltamétricos obtidos é de que a formação do derivado nitroso no processo E_{p2c} advém diretamente do nitro ânion radical, ainda que, no composto *m*-NSF, o processo de formação do radical não seja observado.

Os processos **3c** e **4c** podem ser atribuídos à processos de redução que não ocorrem no grupo nitro dos compostos. Como previamente ilustrado, em valores de pH elevados, o anel furoxano sofre hidrólise, promovendo a liberação de gás NO. O processo **3c** ocorre em valores de potencial que podem ser atribuídos à redução de NO e em concordância ao que é ilustrado na literatura [57]. O processo **4c** pode ser atribuído à porção sulfona da molécula,

já que o processo é largo e ocorre em valores de potencial similares aos observados na literatura, de acordo com [61,62].

O processo **1c** ocorre em valores de potencial menos negativos do que o processo **2c** e, de acordo com o que foi previamente discutido, pode estar associado à redução do grupo nitro na formação de seu primeiro intermediário instável, o nitro ânion radical, de acordo com a reação (R4),



$$6,0 < pH < 10$$

Geralmente é difícil para que esse processo seja registrado em eletrodos de carbono vítreo, devido ao seu curto tempo de vida e alta reatividade com a água. De fato, a maioria dos estudos sobre a caracterização desse radical é realizada em meio orgânico, no qual sua reversibilidade é facilmente observada, ou com o uso de superfícies modificadas que estabilizam o produto radicalar para que o sinal eletroquímico seja detectado [40].

Para confirmar se o processo **1c** pode ser atribuído à formação do ânion do radical nitro, os voltamogramas para ambos os compostos foram conduzidos na presença de oxigênio e cisteína. No primeiro caso, o radical é consumido pelo oxigênio molecular para regenerar o composto nitro original, enquanto no segundo caso, a cisteína induz a formação direta do derivado RNO pela formação de adutos [39]. Nos dois casos, a reação de redução do grupo nitro para nesta etapa.

2.4.2 Influência do oxigênio

Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos com GCE em tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 1,0 mM de *p*-NSF, na ausência (0 s) e na presença de oxigênio com o aumento do tempo de borbulhamento (10 s, 20 s e 30 s), Figura 2.12A. Com o aumento da

quantidade de oxigênio na célula eletroquímica, a magnitude da corrente para o processo **1c** também aumenta.

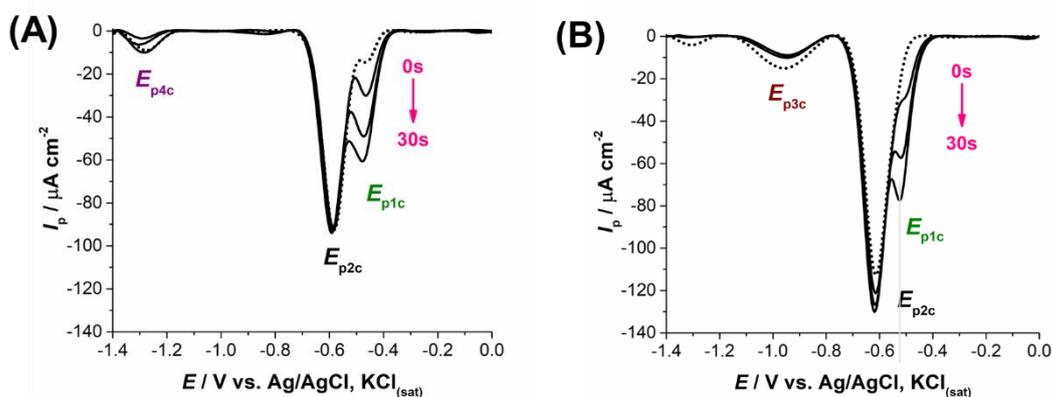


Figura 2.12. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em GCE em solução tampão BR 0,04 M contendo 1,0 mM de *p*-NSF (A) e 1,0 mM de *m*-NSF (B), na ausência e na presença de oxigênio com diferente tempo de borbulhamento (0s a 30s).

Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com GCE contendo *m*-NSF, Figura 2.12B, mostraram que o processo **1c** não está presente nas medidas realizadas na ausência de oxigênio, mas sempre que há disponibilidade de oxigênio, o processo **1c** é distinguido e sua magnitude aumenta com o aumento da quantidade de oxigênio na célula eletroquímica. Isso confirma que o processo **1c** pode ser atribuído à formação do nitro ânion radical, conforme o esperado, e, de acordo com a reação (R5),



na qual o produto intermediário de redução do grupo nitro interage com o oxigênio, gera radicais superóxido e regenera o nitrocomposto inicial, em um ciclo eletrocatalítico.

2.4.3 Influência da cisteína

Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em GCE em tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 0,5 mM de *p*-NSF, na presença de cisteína com concentrações crescentes

(0,25 mM, 0,5 mM e 1,0 mM), na presença e ausência de oxigênio, Figura 2.13A e Figura 2.13B, respectivamente. Em valores baixos de pH, a magnitude da corrente para o processo **2c** diminui com o aumento da concentração de cisteína e, simultaneamente, o pico de potencial desloca para valores menos negativos. Em valores intermediários e elevados de pH, a magnitude de corrente para o processo **1c** diminui na presença de cisteína, até que seja totalmente suprimida em proporções superiores a 1:1 de cisteína/*p*-NSF.

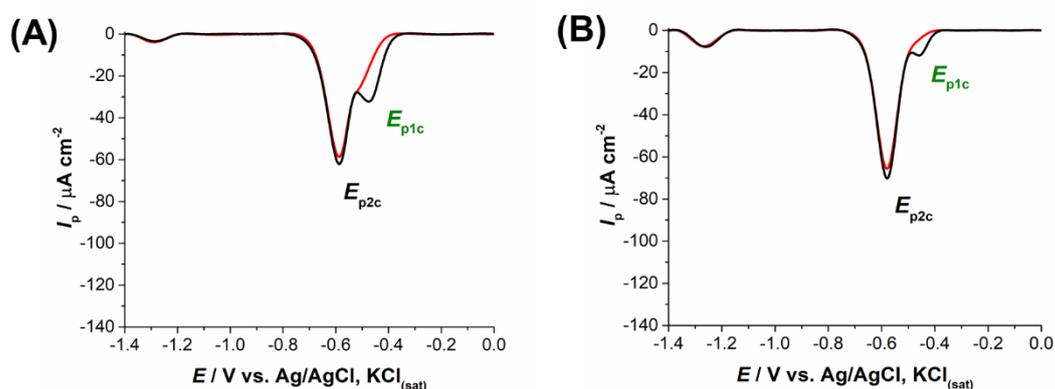


Figura 2.13. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em GCE em solução tampão BR 0,04 M contendo 0,5 mM de *p*-NSF e 0,5 mM de cisteína, na presença (A) e ausência (B) de oxigênio.

A interação do derivado nitroso com moléculas de tiol já foi discutida. Em meio ácido, o derivado nitroso interage com moléculas de cisteína na produção de um aduto, o qual promove a reação química para a formação de hidroxilamina, de acordo com a reação (R6).



$$4,0 < \text{pH} < 6,0$$

Essa reação química é responsável pela diminuição da magnitude de corrente do processo **2c**, porém, sua influência sobre as etapas de redução eletroquímica diminui quanto o valor de pH da medida aumenta. Além disso, na presença de cisteína, a formação do nitro

ânion radical é prejudicada mesmo em meios neutro e alcalino, uma vez que a formação do aduto direciona o processo de redução para a formação direta do derivado nitroso.

2.4.4 Estabilização do $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ e previsão da atividade biológica

Derivados acilidrazônicos contendo o anel furoxano e a porção aromática que apresenta o grupo nitro (*p*-NAF e *m*-NAF), Figura 2.14, foram avaliados quanto à atividade biológica contra a doença de chagas. Através da análise *in vitro*, observou-se um aumento da atividade biológica (IC_{50} (*p*-NAF) = $2,88 \pm 0,38 \mu\text{M}$ e IC_{50} (*m*-NAF) = $9,94 \pm 2,06 \mu\text{M}$) quando o grupo nitro foi substituído na posição *-para* em relação à porção sulfonil em comparação com a substituição *-meta* no anel aromático [58].

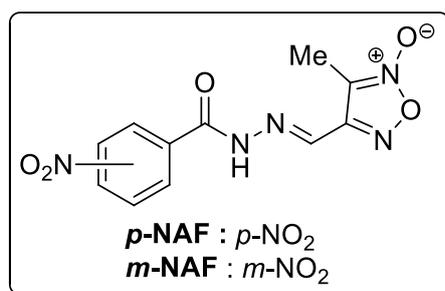


Figura 2.14. Estrutura molecular dos derivados acilidrazônicos *p*-NAF e *m*-NAF.

A substituição da porção intermediária destes bioisómeros (grupo acilidrazônico por sulfonilidrazônico) promove maior atividade biológica e maior seletividade do que o fármaco atualmente empregado (benznidazol) [58]. Além disso, reconhecendo as similaridades estruturais entre *p*-NSF e *p*-NAF, os estudos eletroquímicos para *p*-NSF mostraram um sinal claro sobre a redução do grupo nitro e a geração do intermediário reativo radicalar ($\text{RNO}_2^{\bullet-}$). Espera-se que essas semelhanças estruturais entre esses bioisómeros permitam elucidar não apenas a atividade biológica já incluída do *p*-NAF em comparação ao *m*-NAF (dado que a estabilização do radical seria semelhante à proposta para *p*-NSF e *m*-

NSF) mas também para prever que a atividade biológica do *p*-NSF seja maior do que a observada no *m*-NSF. Estes estudos *in vivo* ainda serão realizados e discutidos em publicações futuras.

2.5 Conclusões

O perfil voltamétrico de dois candidatos antichagásicos foi estudado em meio aquoso com eletrodo de carbono vítreo utilizando diferentes técnicas voltamétricas. O perfil eletroquímico observado para ambos os compostos foi o mesmo considerando, o número de processos de redução e oxidação e seu valor de potencial, provavelmente devido à semelhança estrutural de ambas as moléculas. Tendo em vista a quantidade de porções eletroativas presentes nos dois compostos e o número de processos eletroquímicos distintos visualizados nos voltamogramas cíclicos, dois compostos estruturalmente semelhantes, foram utilizados (nitrobenzeno e *p*-MS). O composto *p*-NSF possuía um processo de redução a mais do que o observado para o composto *m*-NSF, nomeadamente, o processo de redução **1c**, ao passo que todos os demais processos, apesar de apresentarem valor de potencial de pico distintos, possivelmente representassem as mesmas reações de oxidação ou redução em ambos os compostos. Este processo foi atribuído à reação de redução do grupo nitro na formação do seu primeiro intermediário reativo, o nitro ânion radical. O maior tempo de meia vida deste intermediário foi associado ao maior número de cânones de ressonância do nitro ânion radical formado (*p*-NSF^{•-}) em comparação ao seu isômero de posição (*m*-NSF^{•-}). O processo **2c** foi atribuído ao processo de redução do grupo nitro para a formação de hidroxilamina, em meio ácido, e para a formação do derivado nitroso, em meio neutro e alcalino. A interação de ambas as moléculas com oxigênio foi avaliada, a qual indicou um aumento na magnitude de corrente para o processo **1c**, tanto para o composto *p*-NSF, quanto para o composto *m*-NSF, ainda que neste último, o processo só tenha sido observado na

presença de oxigênio. A redução eletrocatalítica do grupo nitro na presença de oxigênio envolve a formação do nitro ânion radical, reação química com o oxigênio para a formação do radical superóxido, e a conseqüente regeneração do nitrocomposto inicial, promovendo uma maior magnitude de corrente para o processo **1c**. A interação de ambas as moléculas também foi avaliada na presença de cisteína, tendo em vista que espécies contendo o grupo tiol apresentam a possibilidade de formar adutos com o derivado nitroso. Foi possível observar que o processo de redução **1c** referente ao composto *p*-NSF sofreu uma diminuição na magnitude de corrente na presença de cisteína, até ser completamente suprimido em concentrações superiores a 1:1 cisteína/*p*-NSF. Além disso, reconhecendo as similaridades estruturais entre o *p*-NSF e o *p*-NAF (bioisómeros dos candidatos antichagásicos cuja atividade biológica já foi comprovada *in vivo*), os estudos eletroquímicos para *p*-NSF mostraram um sinal claro sobre a redução do grupo nitro e a geração do intermediário reativo radicalar ($\text{RNO}_2^{\bullet-}$). Estas semelhanças estruturais entre os bioisómeros podem elucidar não apenas a atividade biológica já descrita do *p*-NAF em comparação ao *m*-NAF (dado que a estabilização do radical seria semelhante à proposta para *p*-NSF e *m*-NSF) mas também para prever que a atividade biológica do *p*-NSF seja maior do que a observada com *m*-NSF.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

Antibióticos são fármacos utilizados no combate a infecções causadas por bactérias, ainda que também sejam utilizados contra outros microrganismos patógenos. Atuam ao causar a morte do parasita ou a inibir seu metabolismo e reprodução. Sua determinação é crucial tanto no controle de qualidade para comercialização de fármacos quanto sua quantificação em ambientes nos quais atuam como poluentes emergentes. Além disso, com o crescimento de bactérias mutantes resistentes ao tratamento, a avaliação do seu mecanismo de ação auxilia no desenvolvimento de estratégias para promover maior atividade biológica, evitar a proliferação e consequente endemia generalizada. Este capítulo aborda a caracterização eletroquímica da cefadroxila e sua determinação em cápsulas comerciais de Duracef®.

3.1 Introdução

3.1.1 Bactérias

Bactérias são seres unicelulares procariotas, primeiramente observados pelo holandês Antonie Van Leeuwenhoek em 1676, embora sua classificação oficial (*Bacterium*) tenha sido estabelecida pelo alemão Christian Gottfried Ehrenberg em 1828, ao observar microrganismos com formato de bastão não formadores de esporos [63]. Estes não possuem parede ao redor do material genético (núcleo), mitocôndria ou qualquer outra organela membranosa, apresentam tamanho micrométrico em diversas formas físicas (esferas, espirais, bastonetes) [64], as quais, em conjunto com seu tamanho, permitem maior distribuição intracelular de nutrientes e secreção de resíduos, devido à alta razão entre a área superficial e volume [65]. Acredita-se também que foram os primeiros seres vivos a habitarem o planeta (principalmente em condições extremas [66]), tendo em vista sua estrutura celular mais simplificada e são encontrados em grande quantidade no corpo humano, nos quais desempenham funções necessárias para a regulação fisiológica [67]. A vitamina B₁₂ participa como cofator na síntese de DNA, no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos e é um grande exemplo da necessidade da simbiose bacteriana no mundo animal, já que sua síntese é quase que exclusivamente realizada por bactérias que compõem a microbiota intestinal [68]. No mundo vegetal, o mutualismo entre bactérias do gênero *Rhizobium* e raízes de leguminosas [69] permite a fixação de nitrogênio e possibilita a conversão de nitrogênio inerte em amônia (disponível para assimilação em organismos vivos).

Ainda que a presença de bactérias seja imprescindível na regulação de parte do metabolismo animal e vegetal, algumas espécies atuam como parasitas, causando danos ao organismo hospedeiro, diretamente através da interação com suas células (uso de nutrientes ou liberação de resíduos) ou indiretamente ao provocar uma resposta imune excessiva e

inapropriada. O parasitismo ocasionado pela presença de bactérias consideradas patógenas é responsável pelo desdobramento de doenças infecciosas cuja transmissão pode ocorrer pelo ar, pelo contato direto ou indireto, sexual, através da amamentação, troca de líquidos corporais ou pela via intestinal [70]. A utilização de antissépticos promove a degradação ou a inibição do crescimento destes microrganismos a fim de reduzir os números de espécies patogênicas para níveis em que o mecanismo de defesa do hospedeiro possa impedir a infecção, ainda que em casos mais graves e em hospedeiros com doenças autoimunes, a proliferação dificilmente é evitada [71]. Doenças como tuberculose, tétano, febre tifoide, difteria, cólera, sífilis, lepra e peste bubônica são causadas por infecções bacterianas, e usualmente tratadas com determinados fármacos designados para combater cada bactéria de forma seletiva, de acordo com sua estrutura e classificação [72].

A parede celular bacteriana, que contém um componente chamado peptidoglicano, confere integridade estrutural à célula, determina sua forma e é responsável pelo controle da pressão osmótica do citoplasma [70]. Tendo em vista sua necessidade para a sobrevivência bacteriana, a parede celular é o alvo principal de ação de vários fármacos, os quais interferem em sua síntese, mas sem afetar células eucariotas que apresentam apenas uma membrana celular. Existem dois tipos principais de construção de paredes celulares bacterianas, as de bactérias gram-positivas e as de bactérias gram-negativas, Figura 3.1, diferenciadas por suas características no teste de coloração de Gram [73], o qual permite avaliar a estrutura da parede celular de bactérias a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos. No caso de bactérias gram-positivas, a camada grossa de peptidoglicano está presente como componente externo da parede celular, ao passo que em bactérias gram-negativas, este se encontra no interior da composição da parede celular, nas quais o componente externo é constituído de lipopolissacarídeos e proteínas [74]. Apesar da camada mais espessa de peptidoglicano as bactérias gram-positivas, quando que comparadas

às bactérias gram-negativas, são mais susceptíveis a determinados fármacos que atuam contra a parede celular, principalmente devido à ausência da membrana externa [75].

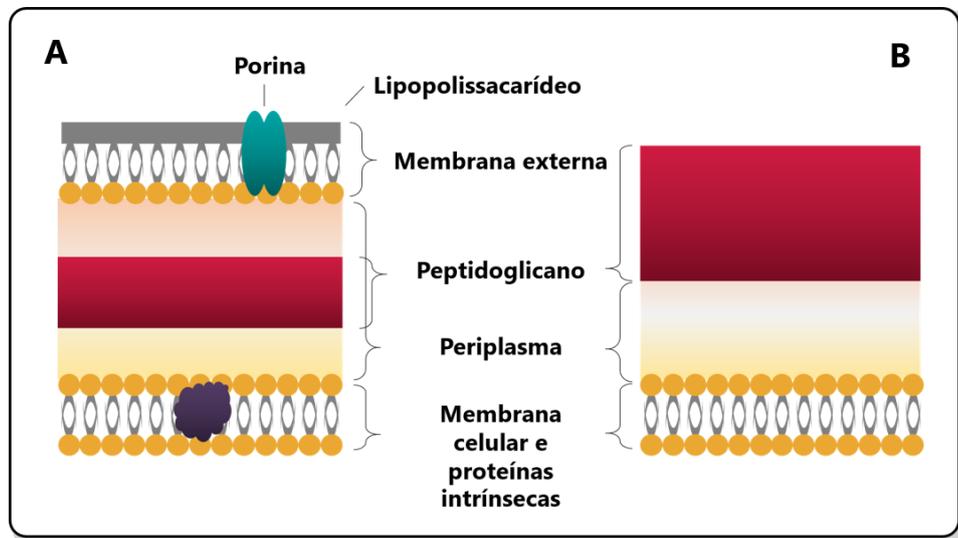


Figura 3.1. Estrutura da parede celular de bactérias (A) gram-negativas e (B) gram-positivas. Adaptado de [76].

3.1.2 Antibióticos

Fármacos utilizados no combate a infecções bacterianas são denominados antibióticos (oriundos do grego *αντί* (anti) e *βιοτικός* (biotikos), "contra um ser vivo"). Estes fármacos promovem a morte direta do microrganismo através da atuação contra a parede celular, membrana celular ou inibição de enzimas de defesa do microrganismo (ação bactericida) ou inibição da síntese proteica necessária para o metabolismo e reprodução (ação bacteriostática) [77] dos mesmos, Figura 3.2.

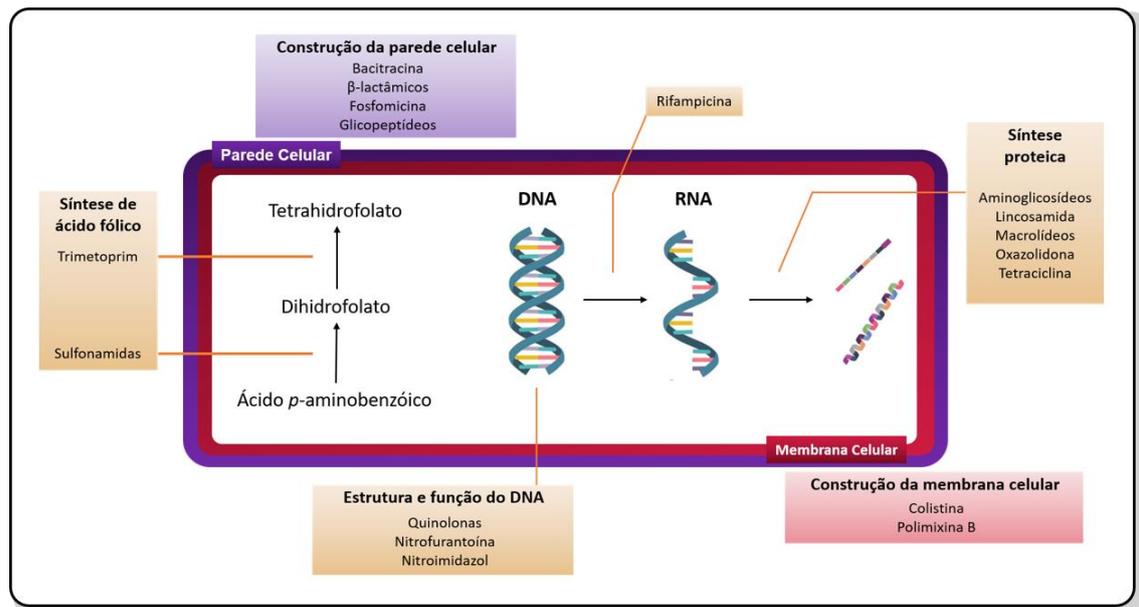


Figura 3.2. Alvo molecular de fármacos antibióticos na célula bacteriana.

Antibióticos podem ser naturalmente obtidos, usualmente por microrganismos em combate a uma determinada bactéria, ainda que também possam ser sintetizados (baseado na fonte natural), como sulfonamidas e antissépticos, estes últimos mais propriamente classificados como fármacos antibacterianos. A avaliação da ação de antibióticos na medicina moderna ocorreu, inicialmente, com o descobrimento de compostos sintéticos derivados de corantes, o que impulsionou o desenvolvimento da imunologia e quimioterapia. Em 1891, o alemão Paul Ehrlich descobriu que certas células ou organismos absorviam corantes seletivamente. Uma dose suficientemente grande poderia ser injetada para matar microrganismos patogênicos, se o corante não afetasse outras células. Uma das primeiras aplicações quimioterápicas bem sucedidas contra enfermidades causadas por bactérias se deu em 1907 com a obtenção da arsfenamina, um derivado de corante, também chamada de composto 606 tendo em vista o número do teste clínico realizado em ratos contaminados com a bactéria *Treponema pallidum* causadora de sífilis [78]. Este fármaco foi desenvolvido através da avaliação de uma classe de organoarsênicos sintéticos na busca pelo conceito da “magic bullet”, ou seja, um medicamento que causasse dano somente à bactéria patógena,

impedindo que atuasse também nas células saudáveis do hospedeiro. Sua comercialização foi iniciada em 1910 sob o nome comercial Salvarsan e substituído em 1913 pelo fármaco consideravelmente menos tóxico Neosalvarsan (também nomeado de composto 914). Nos dias atuais, estes medicamentos foram substituídos pelos então chamados antibióticos β -lactâmicos [79].

3.1.2.1 Antibióticos β -lactâmicos

A avaliação da inibição do crescimento de bactérias realizada pelo contato com outros microrganismos (fungos) serviu como base para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos naturais no começo do século 20, os quais foram e são amplamente utilizados até dias de hoje [80]. As vantagens relacionadas a utilização desta classe de fármacos naturais originavam da baixa toxicidade contra o hospedeiro e grande potencial bactericida contra uma alta gama de bactérias. O estudo desta interação de microrganismos levou à postulação da penicilina em 1928 pelo escocês Alexander Fleming, a qual foi isolada em fungos do gênero *Penicillium*, purificada em 1942 por Ernst Chain, Howard Foley e Edward Abraham, nomeada de penicilina G (cujo nome oficial é benzilpenicilina) e disponibilizada para tratamento em 1945 [81]. A estrutura principal desta classe de compostos se baseia na presença da β -lactama, estrutura constituída por um anel heterocíclico com 3 átomos de carbono e 1 átomo de nitrogênio ligado ao β -carbono relativo à carbonila. Antibióticos β -lactâmicos são utilizados no tratamento contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e são constituídos principalmente por derivados de penicilinas, cefalosporinas, monobactamas e carbapenemas, entre outros.

A ação de antibióticos β -lactâmicos se dá através da inibição da síntese estrutural da parede celular bacteriana a qual é responsável por conferir rigidez à célula de bactérias e evitar a lise osmótica. A seletividade desta classe de fármacos perante o parasita é justificada já que este componente estrutural (peptidoglicano) não está presente na membrana celular

de células eucariotas [81]. O peptidoglicano é um heteropolímero constituído principalmente por cadeias lineares de ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglucosamina. Sua síntese é realizada pela ação de enzimas denominadas PBPs (*penicillin-binding proteins*), as quais são responsáveis pela formação de pontes de pentaglicina (ligações cruzadas) entre as cadeias polissacarídicas, através da interação com resíduos de D-alanina (substrato fisiológico da enzima) presentes nas cadeias proteicas (peptídeos), Figura 3.3.

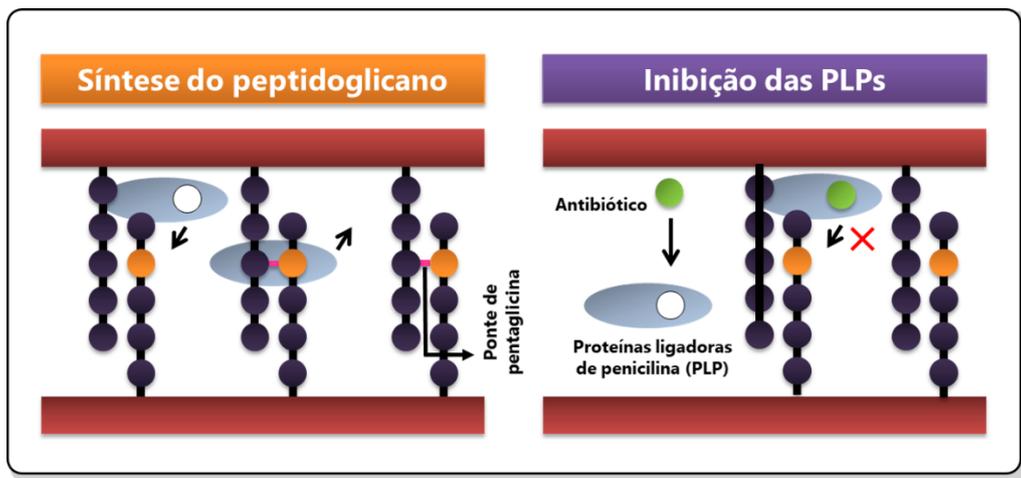


Figura 3.3. Mecanismo de ação de antibióticos β -lactâmicos na inibição da síntese de peptidoglicano.

A similaridade entre a estrutura molecular do anel β -lactâmico e resíduos de D-alanina é responsável pela interação e consequente inibição das PBPs, ainda que sua atividade seja mais comumente associada à sua estrutura conformacional do que ao seu isosterismo [82], Figura 3.4.

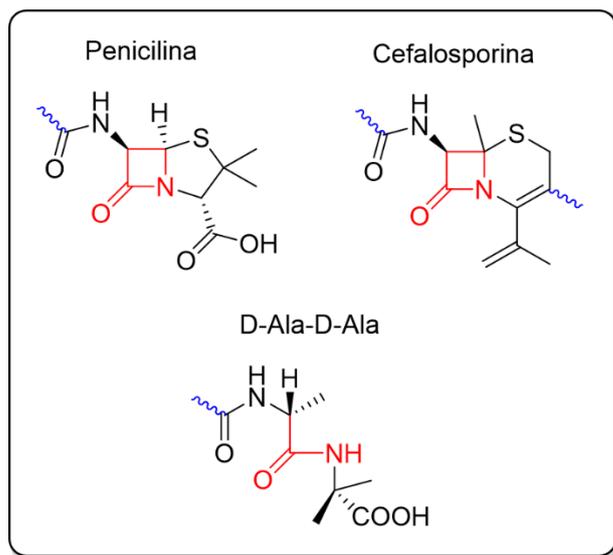


Figura 3.4. Similaridade estrutural entre penicilinas, cefalosporinas e resíduos de D-alanina. Adaptado de [83].

Inclusive, a potência antibiótica desta classe de fármacos está também atrelada à duas características estruturais: a altura (em angstroms) da pirâmide formada pelo átomo de nitrogênio da β -lactama como ápice e os três átomos de carbono adjacentes como base (nomeadamente h , de acordo com o parâmetro de Woodward) e a distância entre o átomo de carbono do carboxilato e o átomo de oxigênio da carbonila (nomeadamente c , de acordo com o parâmetro de Cohen) [84]. Ou seja, é elevada a eficiência de antibióticos β -lactâmicos que apresentem valores mais altos de h (mais reativos à hidrólise) e valores mais baixos de c (melhor interação com as PBPs).

Ainda que alguns fármacos apresentassem eficiência comprovada no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias, o crescimento da resistência bacteriana passou a ser um problema de âmbito mundial [85,86]. Esta resistência é a capacidade de microrganismos ou bactérias de resistir aos efeitos da medicação anteriormente utilizada para tratá-los. Esta resistência foi ocasionada principalmente por fatores como o aumento da quantidade de bactérias resistentes por pressão seletiva (conjunto de condições ambientais

que origina o favorecimento de determinados genes em relação a outros em determinada população), o aumento da disponibilidade global de fármacos desde a década de 1950 e a venda descontrolada em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, nos quais estes fármacos são vendidos usualmente sem receita médica e utilizados muitas vezes sem necessidade [85]. Bactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos apresentam as chamadas beta-lactamases, enzimas capazes de romper o anel β -lactâmico e tornar sua conformação final menos adequada para ancoragem no sítio ativo das PBPs [87]. O desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos menos suscetíveis à ação de beta-lactamases (resistentes à clivagem) ainda é um foco de pesquisa. Inclusive, é frequente a administração concomitante de antibióticos com inibidores como ácido clavulânico, sulbactam ou tazoctam, os quais inativam o sítio ativo das beta-lactamases, impedindo a clivagem da fração do anel β -lactâmico presente nesses antibióticos [88].

3.1.2.1.1 Cefalosporinas

Dentre os fármacos com ação bactericida, as cefalosporinas constituem um grupo de antibióticos β -lactâmicos relacionados com as penicilinas, apresentando diferenças estruturais no anel atrelado à β -lactama, o qual é composto por um anel de 6 membros com um heteroátomo de enxofre [89]. O espectro antibacteriano das cefalosporinas é amplo e algumas de suas propriedades tais como, solubilidade em água, tolerabilidade a ácidos, biodisponibilidade oral, meia-vida biológica e outras propriedades [90], também variam bastante. Foi descoberta em 1948 pelo italiano Giuseppe Brotzu, que isolou compostos de uma espécie de fungos (*Cephalosporium acremonium*) oriundos da costa da Sardenha na Itália, que apresentavam atividade contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* [91]. Os primeiros compostos derivados desta espécie de fungos foram nomeados cefalosporina P, N e C. Tendo em vista que a potência antibiótica destes compostos não era muito elevada, a produção do ácido 7-aminocefalospânico a partir da cefalosporina C (7-ACA, análogo ao

ácido 6-aminopenicilânico) e a incorporação de cadeias laterais nesta estrutura base possibilitou o desenvolvimento de diversas cefalosporinas na busca de fármacos que fossem uma alternativa aos derivados penicilínicos [92]. Em 1959, Sir Edward Abraham avaliou a eficiência do derivado n-fenilacetil da cefalosporina C (cujo nome oficial é *N*-fenilacetil), constatando que este era mais potente contra *Staphylococcus aureus* em comparação ao composto original [93]. A primeira cefalosporina foi comercializada em 1964, sob o nome de cefalotina e usada em infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, infecções do trato urinário, sepse, infecções gastrintestinais, meningite e infecções ósseas e articulares. A segunda cefalosporina foi comercializada e usada em 1970 com o nome de cefaloridina contra infecções no trato urinário. Desde então, tem sido usada com sucesso no tratamento de infecções no trato respiratório. A base estrutural destes dois fármacos possibilitou a utilização de modelagem molecular para o desenvolvimento de derivados semissintéticos de cefalosporinas que são empregados até os dias de hoje [94].

A classe de antibióticos cefalosporínicos é dividida até então em cinco gerações, dependendo da atividade antibacteriana, época de desenvolvimento e base estrutural [90]. Cefalosporinas de primeira geração (cefalexina, cefadroxila, cefalotina e cefazolina) atuam principalmente contra bactérias gram-positivas e apresentam atividade moderada contra *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae*, além de serem administradas sem muitos problemas durante a gestação [95]. As gerações de antibióticos são classificações que os diferenciam no espectro de bactérias aos quais estes antibióticos serão eficientemente utilizados. Quanto maior o número da geração a qual um antibiótico é designado, maior a eficiência contra bactérias gram-negativas (as quais podem ou não apresentar resistência já desenvolvida ao longo dos anos), e menor eficiência em relação as bactérias gram-positivas. Por exemplo, duas cefalosporinas de quinta geração, ceftobiprol e ceftarolina, são os únicos antibióticos β -lactâmicos efetivos contra *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistentes à meticilina. A

atividade terapêutica destes dois compostos só foi obtida porque foram introduzidas propositalmente no C-3, cadeias laterais estáveis na presença de certas beta-lactamases, com a finalidade de promover maior estabilidade metabólica, maior atividade e também para de ancorar em PBPs específicas de *Staphylococcus aureus* e de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina [96].

A cefadroxila pertence à classe das cefalosporinas e é um antibiótico β -lactâmico semissintético de primeira geração, patenteado em 1967, aprovado para uso médico em 1978 e eficaz, após administração oral, contra uma variedade de microrganismos gram-positivos sendo adsorvido no trato gastrointestinal [97], Figura 3.5. É comercializada sob o nome Duracef[®], e empregado no tratamento de infecções leves a moderadas, tais como infecções no trato urinário, no sistema reprodutivo e na pele, além das infecções causadas por espécies de bactérias como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus tonsillitis*. É administrado previamente em procedimentos dentários, principalmente em pacientes com alergia a derivados de penicilina, expelido na urina e pode ser removido por hemodiálise. O uso veterinário pode ser realizado no tratamento de ferimentos infecciosos e, a quantidade administrada varia com o peso e tamanho do animal [98].

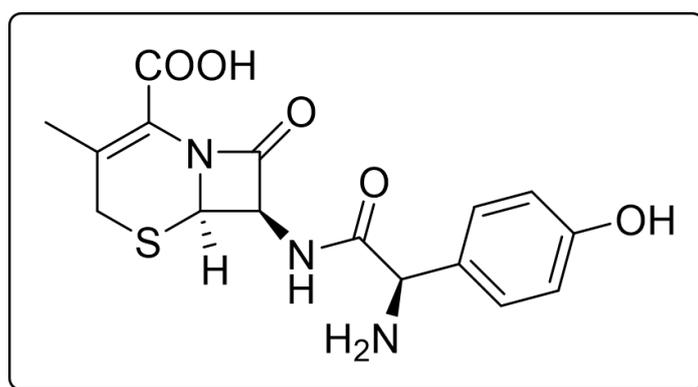


Figura 3.5. Estrutura molecular da cefadroxila.

3.1.3 Caracterização eletroquímica de antibióticos β -lactâmicos

O mecanismo de ação de fármacos comercialmente disponíveis e em desenvolvimento envolve muitas vezes processos de transferência de carga, podendo ser mimetizado *in vitro* usando técnicas eletroquímicas, [99]. Deste modo, correlações entre estrutura química e atividade biológica podem ser efetuadas. A determinação de antibióticos β -lactâmicos é de extrema importância para o monitoramento terapêutico, controle de qualidade e de resíduos, avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência e obtenção de parâmetros farmacocinéticos [100].

Devido à larga janela de trabalho, tanto na região positiva quanto negativa de potencial, o que facilita a compreensão dos processos redox observados, o comportamento eletroquímico de fármacos eletroativos é geralmente caracterizado utilizando eletrodos de carbono. Dentre os eletrodos a base de carbono, os de carbono vítreo ganharam popularidade no campo da eletroanálise por facilitarem a compreensão dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo-solução, principalmente porque o material é quimicamente inerte, apresenta propriedades mecânicas e eletroquímicas adequadas e seu custo é relativamente baixo [101], embora a janela de trabalho dependa do pH.

A quantificação de antibióticos β -lactâmicos tem sido realizada em eletrodos de gotejantes de mercúrio [102–104], eletrodos de diamante dopados com boro [105], eletrodos de carbono não modificados [106–109] e/ou modificados com nanopartículas metálicas [110–114], nanotubos de carbono [115] ou mesmo nanoestruturas inorgânica [112], utilizando técnicas eletroquímicas como voltametria, amperometria e polarografia. Os processos de redução e oxidação dos substituintes das cadeias laterais presentes em cefalosporinas e penicilinas [116,117] são muitas vezes a fonte do sinal eletroquímico, dada a sua eletroatividade.

A redução de complexos de cefalosporinas com cátions como Cu (II), Cd (II), Pd (II) e Zn (II), também foi estudada utilizando polarografia [118] e técnicas voltamétricas [119–124] e nestes casos, a redução do metal nos complexos geralmente ocorre em potenciais mais negativos do que aqueles observados para o metal na ausência do fármaco.

Os mecanismos de oxidação e redução dessa classe de compostos não estão bem elucidados, especialmente em relação às porções próximas ao anel β -lactâmico. Esses produtos de oxidação e redução, que podem ser gerados *in vivo*, alteram a conformação final do composto inicial, interferem na absorção do fármaco através das membranas e, portanto, afetam sua eficiência quando administrados no combate a um agente patógeno específico [85,125]. Além das técnicas eletroanalíticas, as técnicas cromatográficas, predominantemente a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por espectroscopia de absorção de UV-visível [126–128], também tem sido utilizada para quantificação desta classe de compostos. O recente método prescrito na *International Pharmacopoeia* para a determinação analítica de cefadroxila e amoxicilina emprega essa técnica, ainda que envolva o uso de reagentes tóxicos [129].

Neste capítulo será descrito o mecanismo de oxidação eletroquímica da cefadroxila, antibiótico β -lactâmico, uma cefalosporina de primeira geração. O mecanismo de oxidação da amoxicilina, uma penicilina com similaridade estrutural, também foi realizado a fim de avaliar eventuais semelhanças, dada a similaridade estrutural dos dois compostos. A formação de complexos com Cu(II) também será avaliada através de voltametria cíclica para ambos os compostos. Esta caracterização é importante tendo em vista a possibilidade de aumento de sensibilidade na determinação comercial de antibióticos quando estes se encontram na forma de complexos. A determinação de cefadroxila em cápsulas comerciais de Duracef[®] utilizando voltametria de pulso diferencial também será descrita.

3.2 Objetivos

- Caracterizar o mecanismo de oxidação eletroquímica do antibiótico cefadroxila em meio aquoso;
- Caracterizar o mecanismo de oxidação eletroquímica da amoxicilina a fim de compará-lo com o da cefadroxila;
- Avaliar a formação de complexos entre estes dois antibióticos com Cu(II) e caracterizar o perfil de interação, com a finalidade de utilização dos complexos formados na determinação de cefadroxila;
- Quantificar cefadroxila em cápsulas comerciais do antibiótico.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sem prévia purificação. As soluções foram preparadas com água deionizada (18 M Ω cm) obtida com sistema de osmose reversa OS10 LX (Gehaka).

3.3.2 Preparo de Soluções

As soluções de eletrólito utilizadas nas medidas voltamétricas (solução tampão Britto-Robinson (BR) 0,04 M) foram preparadas a partir da dissolução de massa apropriada de borato de sódio (Na₂B₄O₇) e diluição do volume apropriado de ácido fosfórico (H₃PO₄) e ácido acético (CH₃COOH) em água. O ajuste do pH no intervalo de 2,0 e 12 foi feito por adição de pequenos volumes de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6,0 M à solução estoque do tampão. Os estudos de interação antibiótico-Cu(II) foram realizados em tampão HEPES 0,1 M pH 7,0, preparado pela dissolução da massa apropriada do sal em água.

As soluções estoques 5,00 mM de cefadroxila e amoxicilina foram preparadas por dissolução de massa apropriada dos compostos em água e mantidas ao abrigo da luz sob 4 °C quando não utilizadas. A solução estoque 5,0mM de Cu(II) foi preparada por dissolução de nitrato de cobre trihidratado ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em água.

3.3.2.1 *Preparo de amostra comercial de cefadroxila*

Cada cápsula de Duracef^{RM} (Zamora, Espanha) foi pesada, dissolvida completamente em água, submetida em banho de ultrassom e filtrada. O resíduo insolúvel que permaneceu no filtro foi lavado pelo menos 3 vezes, as águas de lavagem foram adicionadas ao filtrado e o volume foi completado a 1000 mL de solução amostra.

3.3.3 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram efetuadas utilizando um μ -Autolab Type II potenciostato / galvanostato controlado pelo software GPES versão 4.9. As medidas espectrofotométricas foram efetuadas utilizando um U-2810 Spectrophotometer Digilab® Hitachi, controlado pelo software UV Solutions Program. As medidas de pH foram efetuadas usando um pHmetro modelo CRISON 2001 micro pH-meter.

3.3.4 Célula eletroquímica e sistema de eletrodos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica constituída de um copo de vidro com capacidade volumétrica de 10 mL. Foi utilizado um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo (GCE, área geométrica = 0,071 cm²). O eletrodo de Ag/AgCl, $\text{KCl}_{(\text{sat})}$ e um fio de platina foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

3.3.4.1 Polimento e limpeza do eletrodo de carbono vítreo

A superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi renovada mecanicamente com polimento utilizando spray de diamante com tamanho de partícula de 1,0 μm (Kemet) como material abrasivo em um feltro (Buehler TexMet C) e posteriormente lavada com água deionizada. O procedimento de renovação da superfície do eletrodo foi realizado antes e após cada medida eletroquímica.

3.3.5 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram efetuadas com o eletrodo de carbono vítreo não modificado, em solução de eletrólito contendo 100 μM de analito: à célula eletroquímica contendo 5,0 mL do eletrólito adicionaram-se 100 μL da solução estoque, de modo a obter a concentração de 100 μM na célula. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas na presença de oxigênio.

Em voltametria cíclica, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 2 mV de rampa de potencial e 100 mVs^{-1} de velocidade de varredura, a menos que indicado o contrário.

Em voltametria de pulso diferencial, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 50 mV de amplitude de pulso, 0,5 s de tempo de intervalo entre pulsos, 0,05 s de tempo de modulação e 2,5 mV de degrau de potencial, resultando em 5 mVs^{-1} como velocidade de varredura, a menos que indicado o contrário.

Em voltametria de onda quadrada, os seguintes parâmetros experimentais foram utilizados: 50 mV de amplitude de pulso, 3 mV de degrau de potencial, 33 Hz de frequência, resultando em 10 mVs^{-1} como velocidade de varredura.

3.3.6 Medidas Espectrofotométricas

Todos os espectros de UV-visível foram obtidos no intervalo de $200 < \lambda < 400$ nm, com uma velocidade de 100 nm/min, intervalo de amostragem de 0,2 nm e caminho óptico de 1 cm. O método da adição de padrão, com adições de 5,0 μ L de uma solução estoque de 3,0 mM de cefadroxila e o comprimento de onda de 229 nm foram usados para a construção da curva analítica.

3.4 Resultados e discussão

A caracterização da oxidação eletroquímica da cefadroxila em eletrodo de carbono vítreo sem modificação prévia foi realizada usando técnicas voltamétricas (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada) em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 próximo do valor de pH biológico, como eletrólito suporte. Tendo em vista que a amoxicilina apresenta estrutura molecular similar a cefadroxila, a oxidação eletroquímica deste fármaco também foi investigada, a fim de avaliar se haveria processos de oxidação comuns a ambos os antibióticos. A diferença de reatividade na porção tiazina/tiazolidina em relação à oxidação do átomo de enxofre presente próximo do anel beta-lactâmico também foi avaliada. Além disso, a formação de complexos entre estes antibióticos e Cu(II) também foi investigada, com a finalidade de propor uma alternativa na determinação de antibióticos com maior sensibilidade.

3.4.1 Caracterização voltamétrica de cefadroxila

Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μ M de cefadroxila, Figura 3.6, apresentam na varredura direta três processos de oxidação em $E_{p1a} = 0,72$ V (**1a**), $E_{p2a} = 1,10$ V (**2a**) e $E_{p3a} = 1,42$ V (**3a**). Na varredura reversa de potencial, um processo de redução é observado em $E_{p0c} = 0,049$ V (**0c**), cujo componente anódico é observado no segundo ciclo de varredura em $E_{p0a} = 0,097$ V (**0a**). Os processos **0c**

e **0a** possivelmente correspondem a um processo reversível, com $\Delta E_p = 48$ mV e $I_{pa}/I_{pc} = 0,85$, aparentemente dependentes do processo de oxidação **1a**.

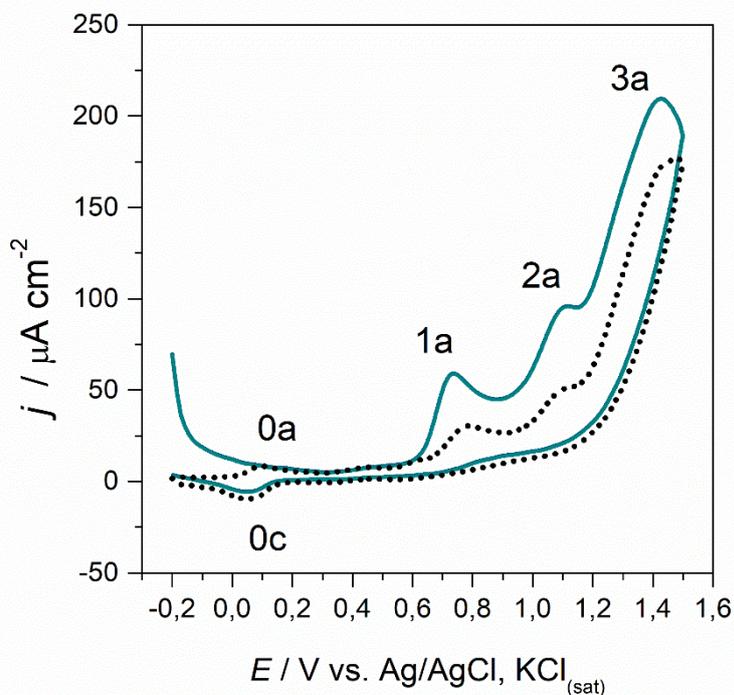
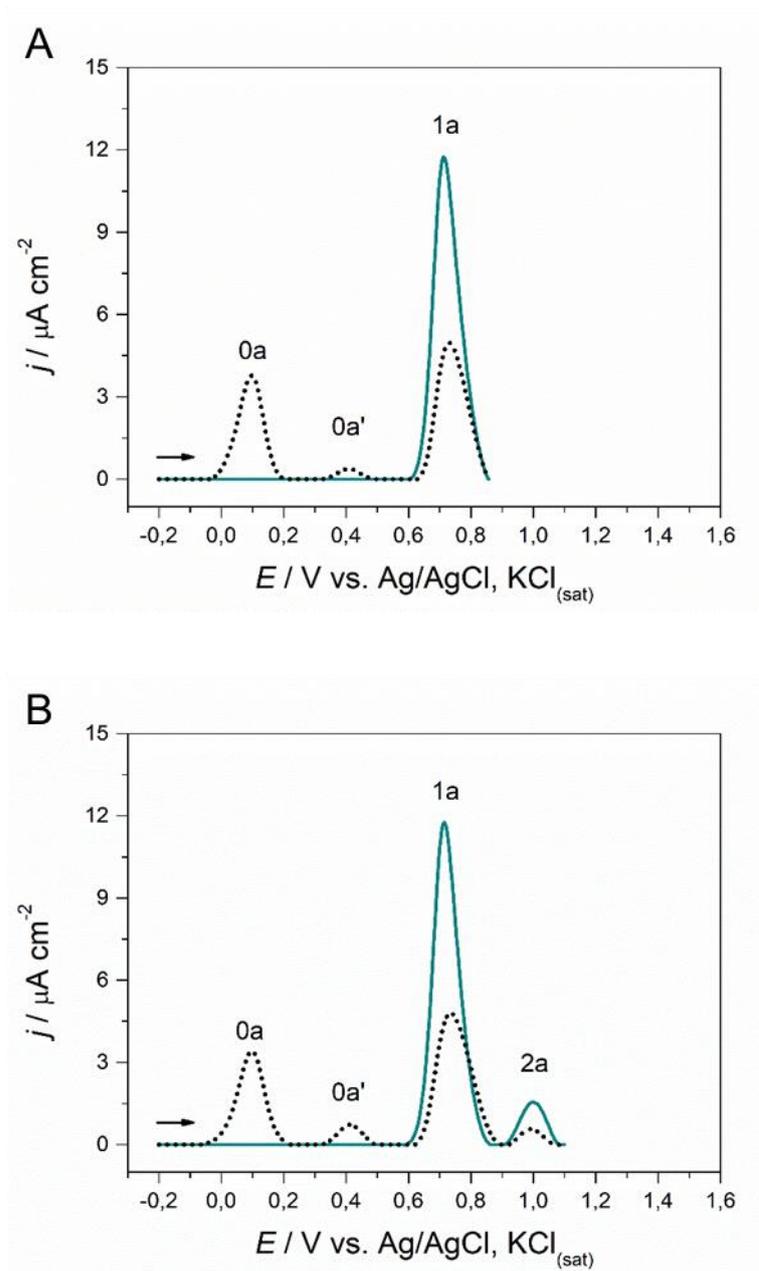


Figura 3.6. Voltamogramas cíclicos (linha-base corrigida) obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μ M de cefadroxila, $v = 100$ mV s⁻¹, primeiro ciclo (—) e segundo ciclo (●●●).

Voltamogramas de pulso diferencial referentes à segunda medida, Figura 3.7, realizada após restringir o potencial final da primeira medida até após os processos **1a** (A), **2a** (B) ou **3a** (C), ilustram que o produto formado após o processo **1a** é eletroativo e responsável pelo par redox observado em **0a/0c**. Além disso, devido à sensibilidade da técnica utilizada, um novo processo de oxidação foi observado, **0a'**. Pode-se dizer que o produto de oxidação do processo **1a** sofre reações químicas acopladas gerando duas novas espécies eletroativas, que são reduzidas e oxidadas em potenciais distintos. Tendo em vista a magnitude dos processos **0a** e **0a'**, acredita-se que um destes produtos de oxidação é mais estável e majoritariamente

formado após a reação química acoplada (espécie oxidada em **0a**), o que explicaria a magnitude de corrente superior em comparação ao processo de oxidação **0a'**.



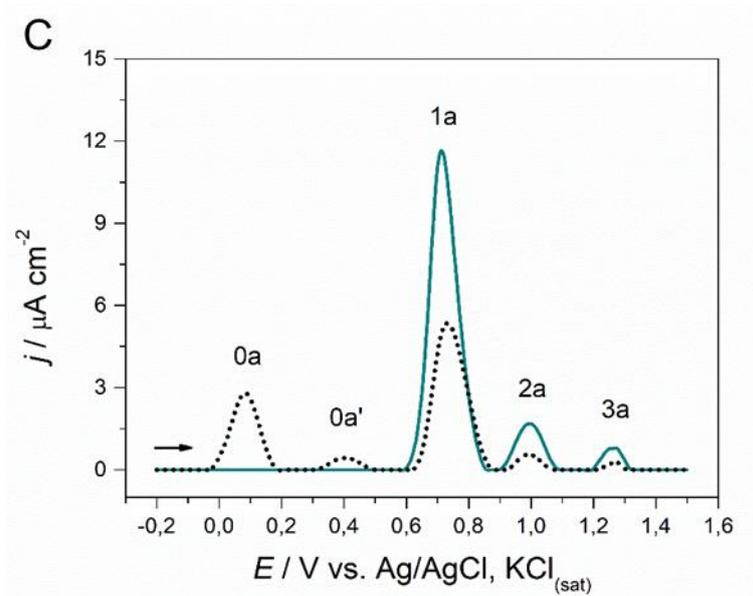


Figura 3.7. Voltamogramas de pulso diferencial (linha base corrigida) obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7.0 contendo 100 μM de cefadroxila, $E_i = -0,2$ V e $E_f = 0,9$ V (A), $E_f = 1,1$ V (B) e $E_f = 1,5$ V (C), primeira medida (—) e medida após agitação da solução (●●●).

Na segunda medida, Figura 3.7C, os processos **1a**, **2a** e **3a** são ligeiramente deslocados para potenciais mais positivos com uma menor magnitude de corrente, o que indica que produtos de oxidação formados ou produzidos podem adsorver na superfície eletródica e dificultar a transferência de carga para medidas subsequentes, nas quais a diminuição progressiva de fato é observada.

Voltamogramas de pulso diferencial obtidos após a primeira medida, apenas transferindo o eletrodo para uma célula contendo eletrólito na ausência do analito, indicam que as espécies formadas após o processo de oxidação **1a** na primeira medida se encontram adsorvidas na superfície eletródica, tendo em vista que os processos **0a** e **0a'** estão presentes, Figura 3.8.

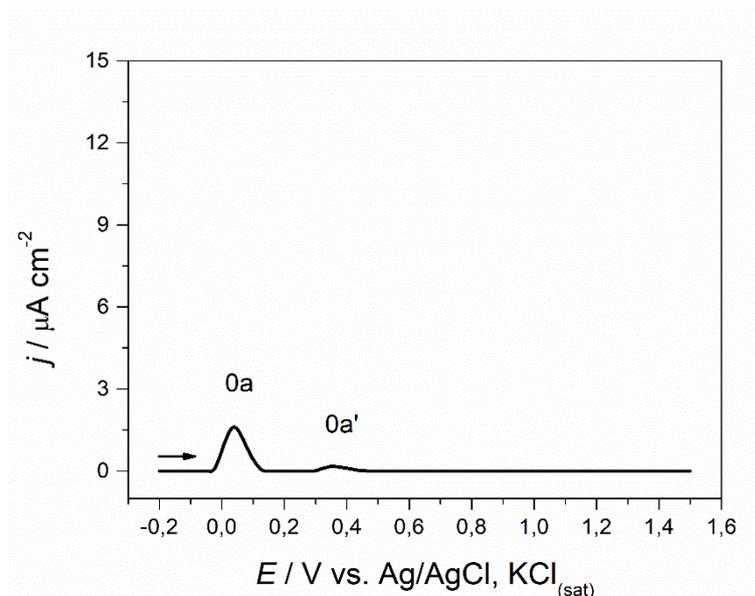


Figura 3.8. Voltamogramas de pulso diferencial (linha base corrigida) obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μM de cefadroxila, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$, (—) 2^o medida em solução tampão sem o analito.

O valor de $W_{1/2}$, obtido através dos voltamogramas de pulso diferencial, fornece uma estimativa do número de elétrons envolvido em cada processo de oxidação, de acordo como ilustrado na equação (1.5) da seção 1.2 do Capítulo 1, Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Diferença de potencial à meia altura ($w_{1/2}$) obtidos através de voltamogramas de pulso diferencial presentes na Figura 3.8.

$W_{1/2}$ (mV)	E_{p1a} / mV	E_{p2a} / mV	E_{p3a} / mV	E_{p0a} / mV	$E_{p0a'}$ / mV
1^o scan	107	108	110	-	-
número de e ⁻	1	1	1	-	-
2^o scan	-	-	-	68	63
número de e ⁻	-	-	-	2	2

Na primeira medida realizada, as reações de oxidação ocorrem com a transferência de um elétron, tendo em vista que o valor de $W_{1/2}$ obtido foi próximo de 90 mV, diferentemente do observado na segunda medida, nos quais os processos **0a** e **0a'** estão presentes e ocorrem com a transferência de dois elétrons.

A reversibilidade dos processos de oxidação foi avaliada usando voltamogramas de onda quadrada, obtidos em condições semelhantes às técnicas voltamétricas previamente utilizadas ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), Figura 3.9. Era esperado que o processo **0a'** não estivesse presente, devido à falta de tempo para que a etapa química fosse significativamente estabelecida. Porém, ambos os processos podem ser observados, possivelmente devido à alta sensibilidade da voltametria de onda quadrada, comparada a voltametria cíclica.

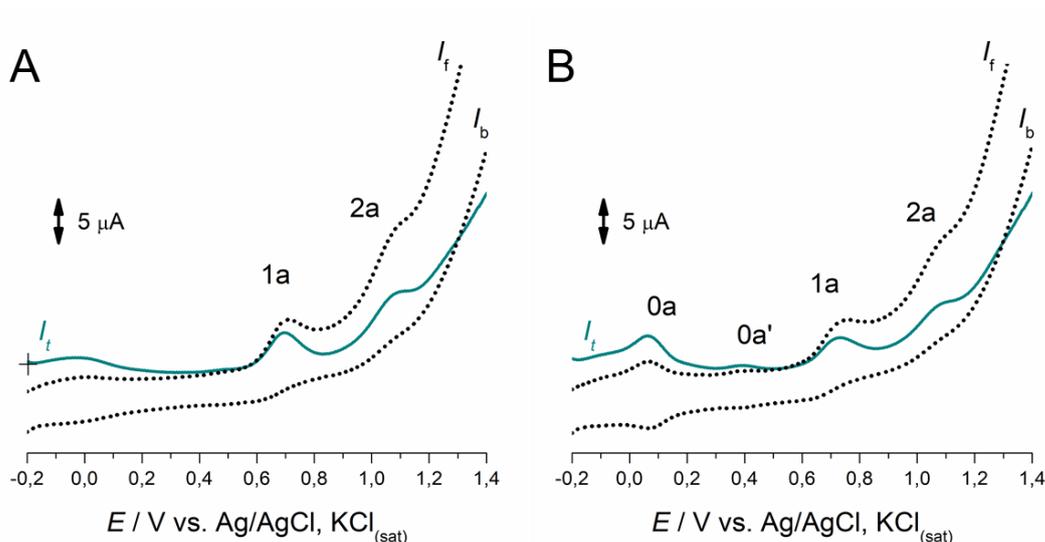


Figura 3.9. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo $100 \mu\text{M}$ de cefadroxila, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, corrente total (—), corrente no sentido direto e inverso (•••), primeira medida (A) e segunda medida (B).

Estes processos apresentam um perfil reversível ($I_f/I_b = 1$ para **0a** e $I_f/I_b = 1$ para **0a'**), com potenciais de pico próximos ao previamente observados. A irreversibilidade do processo **1a** também pode, então, ser comprovada, tendo em vista a ausência da componente catódica no sentido reverso do voltamograma de onda quadrada. O último processo de oxidação observado, **3a**, não foi observado nas medidas realizadas, porém, de acordo com o observado em voltamogramas cíclicos obtidos com o cefadroxila, pode-se inferir que o processo **3a** também é irreversível.

O efeito da velocidade de varredura (voltametria cíclica) nas magnitudes de corrente de pico obtidas com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μM de cefadroxila também foi investigado para o primeiro e principal processo de oxidação, **1a**. Uma resposta linear foi observada no gráfico I_p vs. $v^{1/2}$, Figura 3.10, o que indica que o processo ocorre com controle difusional. O valor do coeficiente de difusão para o cefadroxila em solução tampão BR 0,04 M pôde ser estimado, tendo em vista que, para um processo irreversível, a equação referente à corrente ilustrada na Seção 1.2 do Capítulo 1 pôde ser utilizada.

A equação de reta curva obtida foi $I_{p1a} / \mu\text{A} = 1,71 \times 10^{-7} + 5,99 \times 10^{-6} v^{1/2} / \text{V s}^{-1}$, $R^2 = 0,972$ na faixa de velocidade de varredura entre 10 e 1000 mV s^{-1} . Para um processo de oxidação irreversível e controlado por difusão,

$$E_p - E_{p/2} = 47,7 / (\alpha_a n') \quad (3.1)$$

O valor calculado de α_a para o processo de oxidação **1a** foi 0,59 considerando $n' = 1$, e a área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo ($0,0345 \text{ cm}^2$) foi obtida através do componente angular no gráfico I_p vs. $v^{1/2}$ em uma solução 0,1 M KCl contendo 1,0 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, com $D = 6,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [130].

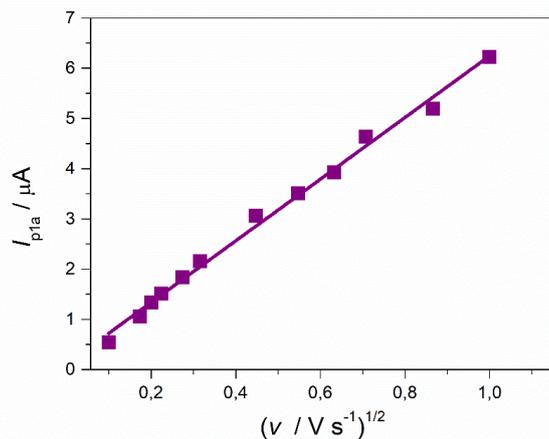


Figura 3.10. Gráfico I_{p1a} vs. $v^{1/2}$. Valores de corrente do primeiro ciclo de voltamogramas obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μ M de cefadroxila.

O coeficiente de difusão obtido para a cefadroxila foi $D_0 = 4,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ que está em concordância com valores obtidos na literatura para outras cefalosporinas [104].

A influência do pH nos potenciais de pico para os processos de oxidação também foi investigada, na faixa linear entre pH 2,0 e pH 12, Figura 3.11.

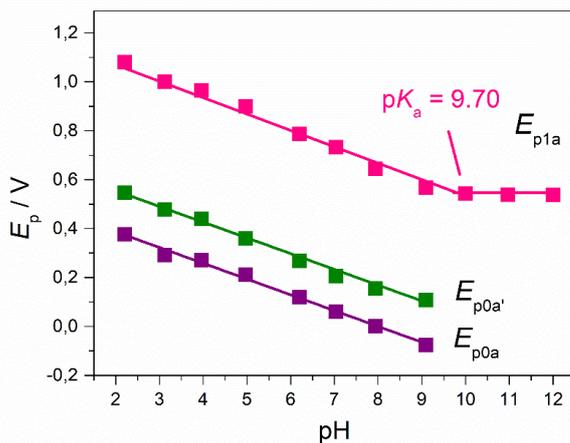


Figura 3.11. Gráfico E_p vs. pH, obtido a partir dos dados fornecidos pelos-voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução contendo 100 μ M de cefadroxila em tampão BR 0,04M, E_{p0a} (—), $E_{p0a'}$ (—) e E_{p1a} (—).

As equações que descrevem os coeficientes angulares das curvas observadas para os processos **0a**, **0a'** e **1a** são:

$$E_{p0a} / V = 0,51 - 0,064 \text{ pH}, R^2 = 0.998 \quad (3.2)$$

$$E_{p0a'} / V = 0,68 - 0,064 \text{ pH}, R^2 = 0.993 \quad (3.3)$$

$$E_{p1a} / V = 1,21 - 0,066 \text{ pH}, R^2 = 0.980 \quad (3.4)$$

Os valores de coeficiente angular para as curvas E_p vs. pH, -64, -64 e 66 mV, respectivamente, para os processos **0a**, **0a'** e **1a**, mostram que o número de prótons nos 3 processos é igual ao número de elétrons, de acordo com 59/pH mV ilustrado na Seção 1.2 do Capítulo 1. O valor de pK_a do grupo envolvido no processo de oxidação **1a** foi estimado como 9,70, figura 3.11.

Os processos de oxidação **2a** e **3a** não são pH dependentes, já que os potenciais de oxidação não variam significativamente com a alteração do pH do meio. A fim de compreender qual porção da molécula está sendo oxidada neste potencial, uma comparação foi feita com a molécula da amoxicilina, que apresenta estrutura molecular similar à da cefalosporina em estudo, com a distinção do grupo tiazina/tiazolidina, Figura 3.12.

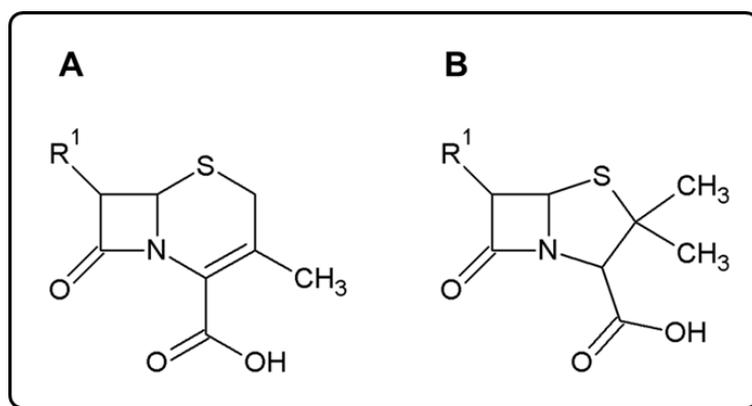


Figura 3.12. Estrutura molecular de cefalosporinas (grupo tiazina) (A) e penicilinas (grupo tiazolidina) (B).

Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em condições similares as previamente realizadas com cefadroxila, Figura 3.13, apresentaram alguns processos de oxidação semelhantes (**0a**, **0a'** e **1a**). Devido à similaridade molecular entre os dois compostos, acredita-se que estes processos ocorram nas mesmas porções para ambas as moléculas. Os processos **2a** e **3a**, para a amoxicilina, foram detectados em valores mais positivos de potencial, $E_{p2a} = 1,15$ V e $E_{p3a} = 0,128$ V, com menor resolução e magnitude de corrente do que o observado para o cefadroxila.

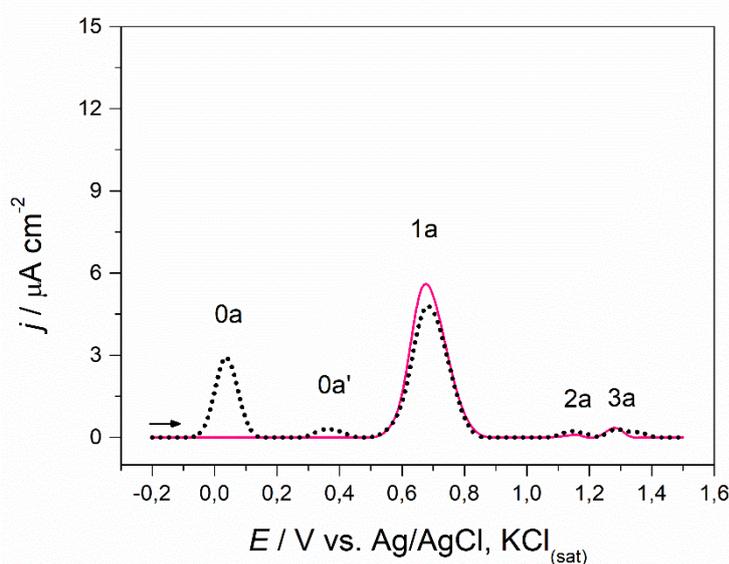


Figura 3.13. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo 100 μ M de amoxicilina, $v = 5$ mV s⁻¹, primeira medida (—) e medida após agitação da solução (●●●).

Esta comparação indica que estes processos possivelmente ocorrem no átomo de enxofre presente próximo ao anel beta-lactâmico de ambos os compostos. Tendo em vista que a diferença estrutural entre a penicilina e a cefalosporina ocorre exatamente na porção tiazina/tiazolidina, a energia necessária para promover a oxidação do átomo de enxofre é distinta para as duas moléculas, e isto se reflete no deslocamento dos potenciais de pico e magnitude de corrente voltamogramas obtidos. A posição do enxofre no anel hexacíclico do

cefadroxila facilita o processo de oxidação, diferentemente do enxofre presente na amoxicilina, cujo anel pentacíclico não estabiliza o fluxo eletrônico relacionado ao produto de oxidação gerado.

3.4.2 Mecanismo de oxidação do cefadroxila em meio aquoso

Um mecanismo ECE (eletroquímico – químico – eletroquímico) pode ser atribuído ao primeiro processo de oxidação do cefadroxila, **1a**, tendo em vista que a porção fenol da molécula é oxidada em um processo envolvendo um elétron e um próton. O pK_a fornecido pelo diagrama de Pourbaix (E_p vs. pH) para este processo coincide com o valor teórico para o grupo fenol, $pK_a = 9,48$ [131]. Um radical fenoxil é formado durante o processo de oxidação, sofre ataque nucleofílico e produz derivados de catecol e resorcinol. É improvável que o derivado de hidroquinona seja formado, tendo em vista que a porção do anel correspondente a posição *-para* está ocupada e dificilmente atua como um grupo de saída. Os derivados de catecol e resorcinol são imediatamente oxidados a quinonas, mediante o potencial aplicado, reduzidos na varredura reversa e reoxidados no ciclo subsequente (processos **0a** e **0a'** para o derivado de catecol e resorcinol, respectivamente), em um processo envolvendo 2 elétrons e 2 prótons [132]. Esta porção da molécula é similar a molécula da amoxicilina, que sofre um processo de oxidação similar.

O mecanismo de oxidação proposto para os processos **2a** e **3a** é menos trivial, tendo em vista que ocorre em valores mais positivos de potencial, de modo que a reação de transferência de carga pode ser afetada pela presença de moléculas derivadas de quinona, previamente adsorvidas na superfície eletrodica.

De acordo com a literatura, o heteroátomo de enxofre presente no anel hexacíclico próximo ao anel beta-lactâmico é oxidado em um processo envolvendo 2 elétrons, 2 prótons e uma molécula de água, produzindo sulfóxido e sulfona na etapa subsequente. Estes

processos são também observados nas medidas realizadas em solução de amoxicilina, porém, tendo em vista que a estabilização do produto de oxidação no anel pentacíclico é menor do que no anel hexacíclico do cefadroxila, estes são detectados em valores mais positivos de potencial, com uma menor resolução e magnitude de corrente.

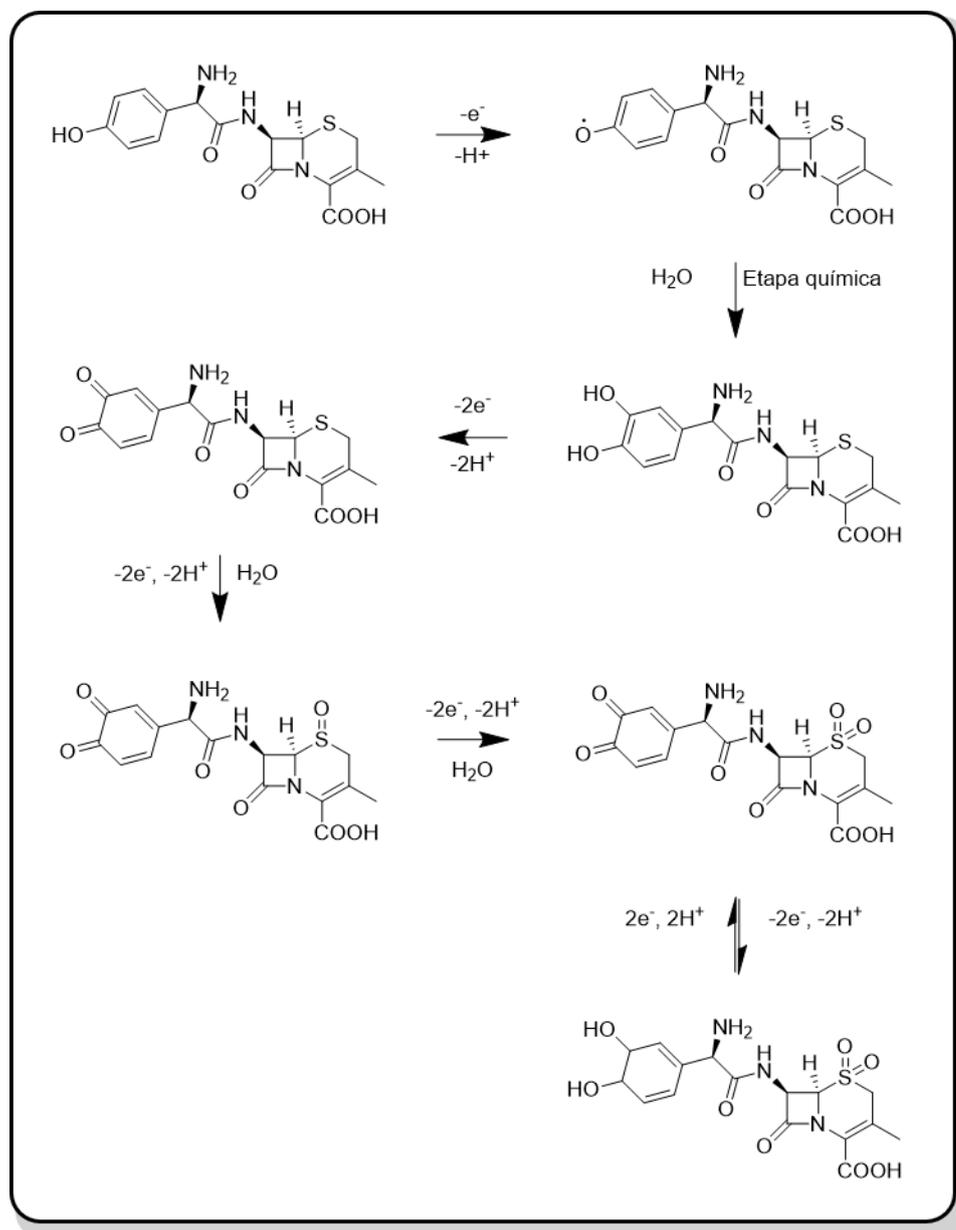


Figura 3.14. Mecanismo eletroquímico proposto para o cefadroxila utilizando eletrodo de carbono vítreo, o qual acompanha a varredura direta de potencial e somente as últimas etapas refletem a varredura reversa.

O processo de oxidação **2a**, atribuído à formação de sulfóxido, se origina a partir da oxidação de espécies intermediárias adsorvidas no GCE, já que estes processos não foram detectados quando eletrodos de diamante dopados com boro (BDDE) foram usados. Nestes, contrariamente ao observado em resultados obtidos com GCE, somente o processo de oxidação que gera diretamente o produto final, sulfona, se faz presente, possivelmente devido ao caráter não-adsortivo da superfície eletródica [133]. O mesmo mecanismo foi observado para metionina utilizando BDDE [134].

3.4.3 Formação de complexos entre cefadroxila e amoxicilina e Cu(II)

O comportamento eletroquímico de complexos de Cu(II) com diversos antibióticos foi investigado anteriormente [34,35]. Para avaliar a interação entre os íons de cobre (II) e a cefadroxila, foram obtidos voltamogramas cíclicos em soluções tampão HEPES 0,1 M pH 7,4 contendo inicialmente 200 μM de Cu^{2+} e 100, 200 e 400 μM de cefadroxila, Figura 3.15. Esta solução tampão foi usada para evitar interferência de agentes complexantes de metais como íons fosfato e cloreto, presentes em outras soluções tampão biológicas.

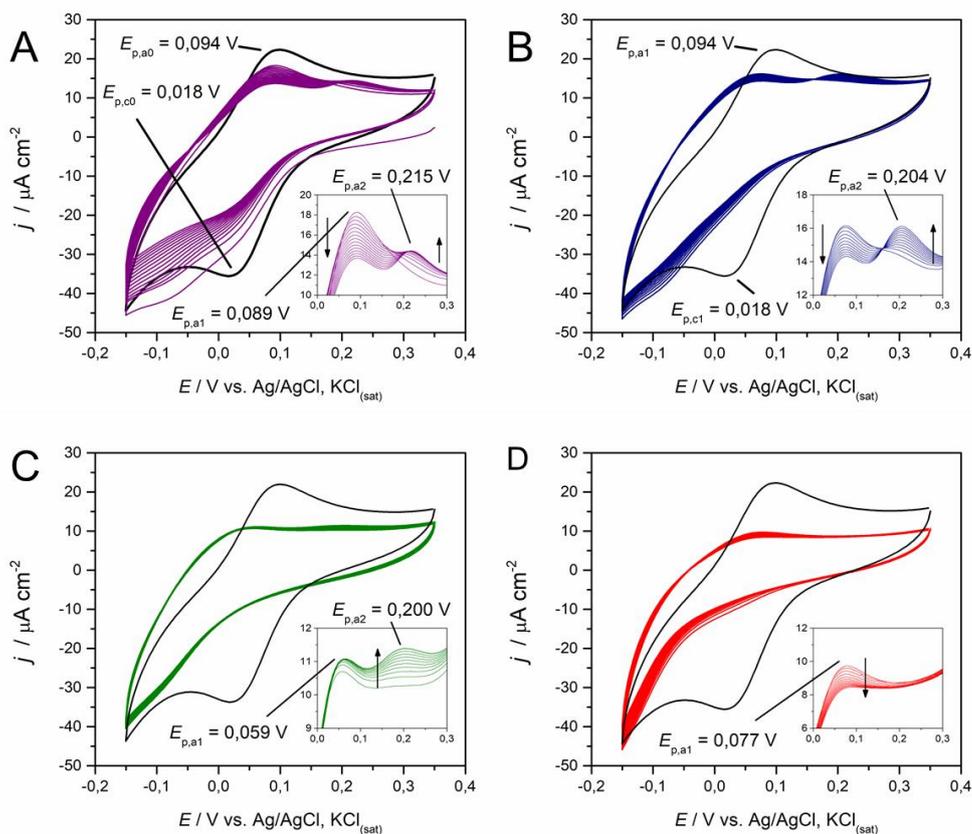


Figura 3.15. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão HEPES 0,1 M, pH 7,4 contendo 200 μM de Cu^{2+} (—), Cu^{2+} :cefadroxila na proporção 2:1 (—) (A), Cu^{2+} :cefadroxila na proporção 1:1 (—) (B), Cu^{2+} :cefadroxila na proporção 1:2 (—) (C) e Cu^{2+} :amoxicilina na proporção 1:1 (—) (D), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O potencial de pico para redução de Cu^{2+} é deslocado para valores mais negativos e a magnitude da corrente é drasticamente reduzida. Ao mesmo tempo, o processo de oxidação ($E_{p,a0}$) referente à reação reversa se desloca para potenciais menos positivos na presença dos antibióticos ($E_{p,a1}$), mas a corrente deste processo diminui com o número de ciclos à medida que outro processo de oxidação aparece com valor de potencial mais positivo e com magnitude de corrente que cresce sequencialmente a cada ciclo ($E_{p,a2}$). Existe, portanto, uma mudança progressiva no perfil do voltamograma à medida que a quantidade de cefadroxila aumenta em relação a uma concentração fixa de Cu^{2+} , de modo que a redução do Cu^{2+} é totalmente suprimida, devido à formação de um complexo.

Para a amoxicilina, a evidência de que o complexo é formado também pode ser deduzida através do desaparecimento do processo de redução do Cu^{2+} , mas nenhum processo de oxidação aparece no sentido positivo. O complexo pode ser mais estável, sendo oxidado em potenciais ainda mais positivos e fora da janela potencial utilizada.

Tendo em vista o valor baixo de potencial em que o processo de oxidação, $E_{p,a2}$, ocorre, há a possibilidade de utilizar o complexo Cu(II)-cefadroxila formado para a determinação do antibiótico. Este estudo não foi realizado neste trabalho e será abordado em publicações futuras.

3.4.4 Determinação eletroquímica de cefadroxila

3.4.4.1 Obtenção da curva analítica

A voltametria de pulso diferencial (DPV) foi utilizada para a construção da curva analítica para o cefadroxila usando os valores da corrente referentes ao primeiro processo de oxidação (**1a**). Os voltamogramas foram obtidos em triplicata com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0, efetuando-se adições de cefadroxila no intervalo de 1,0 a 5,0 μM , Figura 3.16. Esse valor de pH foi utilizado por ser uma condição próxima ao meio fisiológico e por apresentar as mais altas magnitudes de corrente. Já o primeiro processo de oxidação, **1a**, foi escolhido para a construção da curva por ser controlado por difusão, apresentar a maior magnitude de corrente (em relação aos outros processos) e, pela ausência de reações químicas acopladas, que venham a produzir espécies que adsorvam na superfície eletródica. De acordo com a curva analítica obtida, $j_p / \text{nA cm}^{-2} = 2,14 + 118 [\text{Cefadroxila} / \mu\text{M}]$, $R^2 = 0,994$.

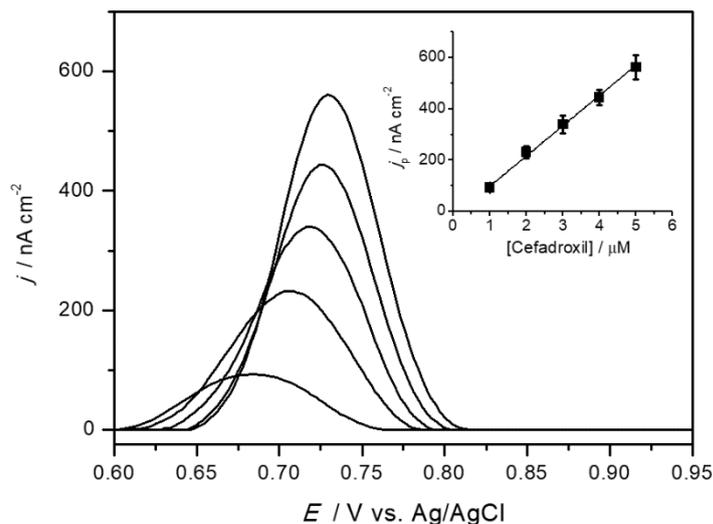


Figura 3.16. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR 0,04 M pH 7,0 contendo concentração crescente de cefadroxila, amplitude de pulso = 50 mV, potencial step = 2,5 mV, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Inset: curva analítica j_p vs. [Cefadroxila / μM] com $j_p / \text{nA cm}^{-2} = 2,14 + 118 [\text{Cefadroxila} / \mu\text{M}]$.

O potencial se desloca para valores mais positivos com o aumento da concentração de cefadroxila e, acima de $10,0 \mu\text{M}$, a magnitude de corrente para o primeiro processo de oxidação passa a ser inferior às medidas previamente obtidas, provavelmente devido aos derivados de hidroquinona adsorvidos na superfície do eletrodo. O limite de detecção calculado foi de $0,3 \mu\text{M}$, usando 3 vezes o desvio padrão do espaço em branco dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação, 3,33 vezes o valor do limite de detecção, coincide com a concentração referente à primeira adição do analito. Estes cálculos estão indicados no Apêndice I.

Tendo em vista a possibilidade de obter uma curva analítica para a determinação de cefadroxila em meio aquoso com baixos valores de erro, esse procedimento foi utilizado para determinar o cefadroxila em amostras de cápsulas comerciais.

3.4.4.2 Análise de amostras de cápsulas comerciais

O princípio ativo presente em amostras comerciais da Duracef[®] foi determinado utilizando eletrodo de carbono vítreo e voltametria de pulso diferencial em tampão BR 0,04 M pH 7,0.

Tabela 3.2. Dados obtidos para a determinação do princípio ativo em cápsulas comerciais de Duracef[®] de voltamogramas de pulso diferencial registrados com GCE ($n = 3$).

Amostra	Especificado / μM	Adicionado / μM	Encontrado / μM	Recuperado / %	RSD / %
Duracef [®]	1.00	0.00	0,99	99,0	1,65
	1.00	1.00	1,84	92,2	1,61
	1.00	2.00	2,75	91,6	1,18
	1.00	3.00	3,70	92,6	1,03
	1.00	4.00	4,55	90,9	1,11

Os resultados comparados foram comparados aqueles obtidos por espectroscopia UV-vis utilizando a mesma matriz e o método de adição padrão, mas em uma faixa linear diferente devido à diferença de sensibilidade das duas técnicas (no caso das medidas realizadas em espectrometria de UV-visível, a faixa linear de concentração avaliada foi de 5,0 a 50 μM).

Nas medidas eletroquímicas, os excipientes presentes na cápsula não interferiram em nenhum dos processos de oxidação, mas houve um maior deslocamento no potencial de pico após cada adição e menor aumento de corrente mediante adição da solução do padrão. Assumindo que todo o princípio ativo foi dissolvido, uma vez que a quantidade de água utilizada foi superior à necessária de acordo com a solubilidade do composto (1,11 g L⁻¹ em solução aquosa [98]), os valores de recuperação calculados a partir da adição de uma solução padrão de cefadroxila foram superiores a 90% para a faixa linear de concentração estudada (1,0 a 5,0 μM), indicando também que o método utilizado é confiável

na determinação de cefadroxila na matriz da cápsula. De acordo com os valores obtidos para esta determinação utilizando voltametria de pulso diferencial (todas as medidas realizadas em triplicata), foi possível estimar uma quantidade de $4,99.10^2 \pm 0,08.10^2$ mg para cada cápsula, valor próximo ao indicado pelo produtor e validado com medidas espectroscópicas (UV-vis), nas quais foram estimadas $4,8.10^2 \pm 0,1.10^2$ mg para a amostra avaliada (dados não ilustrados).

3.5 Conclusões

A oxidação eletroquímica do cefadroxila foi estudada em meio aquoso usando eletrodo de carbono vítreo não modificado utilizando diferentes técnicas voltamétricas. O processo de oxidação se inicia com a formação de um radical fenoxil e, após ataque nucleofílico pela água, derivados de catecol e resorcinol são formados e oxidados de acordo com um mecanismo ECE. Os produtos, quinonas adsorvem na superfície do eletrodo e envenenam a superfície eletródica, que deve ser polida para que a medida subsequente não seja comprometida. A comparação entre o perfil de oxidação eletroquímica do cefadroxila e da amoxicilina permitiu identificar o processo de oxidação do heteroátomo do enxofre, próximo ao anel β -lactâmico, processo este, comum para ambos os antibióticos. No caso do cefadroxila, a oxidação do heteroátomo de enxofre ocorreu em potenciais menos positivos e com uma resolução e magnitude de corrente superiores às observadas em solução de amoxicilina. O coeficiente de difusão (D_0) calculado para o cefadroxila em tampão BR 0,04 M pH 7,0 foi igual a $4,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, valor próximo ao reportado na literatura para outras cefalosporinas [104]. A formação de um complexo entre os íons Cu(II) e cefadroxila e amoxicilina foi confirmada usando voltametria cíclica, o qual pode ser utilizado com a finalidade de identificar e quantificar cefadroxila utilizando o potencial de oxidação do Cu^{2+} na forma de complexo. A curva analítica para a determinação de cefadroxila foi construída

com dados obtidos em voltamogramas de pulso diferencial, baseados no primeiro processo de oxidação (**1a**), ou seja, a porção fenólica, e o método foi aplicado com sucesso na quantificação de cefadroxila em amostras comerciais.

CAPÍTULO 4

CONSTRUÇÃO DE SENSORES UTILIZANDO MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

Ainda que amplamente empregados em eletroanálise, eletrodos de carbono recém polidos apresentam desvantagens inerentes os quais diminuem a sensibilidade e reprodutibilidade das medidas realizadas. A fim de minimizar processos de adsorção, aumentar a janela de potencial de trabalho, e, por vezes, diminuir a corrente de fundo, podem-se empregar agentes modificadores externos que ampliam as opções e possibilidades de arquitetura da modificação da superfície eletródica visando à quantificação ou estudo de um analito alvo. Os agentes modificadores são deliberadamente imobilizados na superfície do transdutor original com o objetivo de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Este capítulo aborda a vantagem na utilização de um eletrodo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro na caracterização eletroquímica da cefadroxila e sua determinação em cápsulas comerciais de Duracef[®].

4.1 Introdução

Com o desenvolvimento de novas metodologias eletroquímicas para a determinação e caracterização de diversos analitos, a utilização de novas superfícies eletródicas que apresentem propriedades químicas e físicas atrativas se fez necessária, a fim de superar as desvantagens até então atreladas ao uso de superfícies eletródicas convencionais. Fatores como baixa velocidade de transferência de carga entre o analito e a superfície eletródica, somado a fenômenos de corrosão e passivação, além da baixa seletividade e alta gama de interferentes possíveis impulsionaram o desenvolvimento de dispositivos denominados eletrodos modificados. A variabilidade na construção de novas arquiteturas superficiais, usualmente atreladas a vantagens como aumento da seletividade e sensibilidade, resistência a fenômenos de adsorção, pré-concentração de espécies, aumento das propriedades eletrocatalíticas e limitação do acesso de interferentes (em amostras complexas), tornou atrativa a utilização destes dispositivos, que foram e continuam a ser empregados em eletroanálise até os dias atuais.

Eletrodos modificados podem ser construídos com a incorporação de materiais nanométricos, poliméricos, ou até mesmo com elementos de reconhecimento biológico eficientemente ancorados na superfície eletródica, modificando as propriedades eletrônicas do transdutor e promovendo a alteração da sua funcionalidade. Os métodos de imobilização baseiam-se em processos de adsorção (química e física), formação de ligações covalentes, revestimentos incorporados devido à insolubilidade do material na solução de contato e até mesmo através da formação de compósitos, nos quais um agente modificador é misturado diretamente ao material que compõe o eletrodo convencional [135–139].

Eletrodos de carbono vítreo são comumente utilizados em eletroanálise, principalmente já que não apresentam processos de oxirredução próprios, o que facilita a compreensão de fenômenos que ocorrem na interface eletrodo-solução. Além disso,

apresentam propriedades mecânicas e eletroquímicas adequada, ampla janela de trabalho (ainda que dependente do pH), são quimicamente inertes e possuem custo relativamente baixo. No entanto, fenômenos como passivação de produtos de reações eletroquímicas e o bloqueio superficial devido à presença de resíduos provenientes do material abrasivo são desvantagens inerentes à utilização deste transdutor, diminuindo a sensibilidade e reprodutibilidade das medidas realizadas [61,140,140–142]. Uma alternativa no controle destes problemas é o pré-tratamento da superfície eletródica, de modo a criar grupos funcionais que favoreçam os processos anódicos e catódicos do analitos alvo [143]. Agentes modificadores externos também são comumente utilizados como alternativa já que reduzem efeitos de processos de adsorção e, por vezes, diminuem a corrente de fundo. Estes agentes modificadores abrangem nanomateriais de carbono [144], polímeros [145], nanopartículas metálicas [146] e componentes biológicos, como enzimas ou proteínas [133,136], promovendo um aumento na razão sinal/ruído, seletividade e reprodutibilidade.

Nanotubos de carbono são amplamente empregados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, já que apresentam propriedades mecânicas, térmicas, elétricas e ópticas elevadas, além de também possuir biocompatibilidade e configuração de ligação atômica e composição química simples [147–151]. O seu tamanho nanométrico confere maior superfície de contato com analitos alvo, promovendo um aumento no sinal analítico e por vezes, uma facilitação nos processos de cinética eletroquímica tendo em vista suas propriedades catalíticas [152]. Estas estruturas são constituídas de folhas de grafeno formados a partir do enrolamento das mesmas a partir do seu próprio eixo, formando estruturas cilíndricas com diâmetros na faixa dos nanômetros, e comprimentos que variam de alguns micrometros até vários centímetros [153]. As ligações entre as cadeias carbônicas são da natureza sp^2 - sp^2 e conferem uma resistência extremamente elevada a este material, associada a flexibilidade, sem que haja destruição de sua estrutura nanométrica.

Basicamente, existem dois grupos principais de nanotubos de carbono: nanotubos de parede simples ou nanotubos de parede múltipla. Nanotubos de parede única (swCNTs) consistem em uma única folha de grafite enrolada em um cilindro de 0,4 a 2 nm de diâmetro, e apresentam condutividade variada dependendo de sua quiralidade, atrelada ao ângulo à qual as folhas de carbono estão conectadas lateralmente e, conseqüentemente, com o alinhamento dos orbitais π . Nanotubos de parede múltipla (MWCNTs) correspondem a tubos concêntricos e fechados com várias camadas de folhas de grafite com diâmetro de 2 a 100 nm, separados por uma distância de 0,34 nm, aproximadamente, apresentam condutividade metálica, o que os torna atrativos quanto empregados como materiais eletródicos ou agentes modificadores. Além disso, apresentam, nas extremidades, átomos com ligações incompletas, constituindo defeitos no material. A presença de heteroátomo, pentágonos, heptágonos e átomos de carbono com ligações sp^3 ligados a grupos funcionais distintos, afetam as propriedades e por vezes, permitem a modificação química de sua estrutura. No geral, este pré-tratamento por vezes é necessário com a finalidade de eliminar impurezas metálicas, melhorar as propriedades de transferência de elétrons e/ou permitir maior funcionalidade. Nestes casos, as extremidades e as paredes laterais podem tornar-se ricas em funções oxigenadas, principalmente grupos carboxílicos. Dependendo de quão drástico é o tratamento, é possível não apenas aumentar a densidade das funções oxigenadas, mas também quebrar os tubos ou até encurtá-los [149]. A funcionalização de nanotubos por tratamento em soluções ácidas tem sido amplamente utilizada, principalmente as que envolvem soluções de ácido sulfúrico, nítrico e clorídrico, usualmente concentrados.

Alterar a superfície de nanotubos de carbono afetam fortemente suas propriedades em termos de solubilidade, o que pode, por vezes, facilitar sua utilização quando empregado na construção de sensores. Inclusive, em eletroanálise, observam-se usualmente valores de potencial de pico mais próximos de zero e magnitudes de corrente mais altas no sinal

analítico de um analito alvo [137]. Isso impulsiona sua utilização, tanto como modificação final, quanto como superfície base para o ancoramento de polímeros [154–156], enzimas [157–161] e até mesmo nanopartículas [162].

Neste último caso, nanopartículas de ouro também são amplamente utilizadas tendo em vista suas propriedades catalíticas também associadas ao seu tamanho nanométrico. Supondo que seus diâmetros sejam menores que 100 nm, altas densidades de corrente são usualmente observadas, baixos valores relacionados a capacitância da dupla camada, e aumento da razão sinal/ruído. Existem dois métodos principais para fabricar nanopartículas de ouro, estas utilizadas em distintas aplicações, dentre as quais a construção de eletrodos para a utilização em medições eletroanalíticas se destaca, baseado na redução de compostos de Au (III) em soluções aquosas utilizando citrato, método desenvolvido por Turkevitch *et al* em 1951, o qual possibilita a formação facilitada de nanopartículas de ouro de até 50 nm de tamanho [163]. Esta metodologia não só promove a redução do ouro para a formação das nanopartículas, como também auxilia na dispersão entre as mesmas, e constitui uma das metodologias mais comuns quando empregadas na construção de sensores. Neste caso, estas são depositadas diretamente na superfície do eletrodo ou em demais modificações, promovendo uma maior cobertura da área superficial disponível. Eletrodos modificados construídos com nanotubos de carbono e nanopartículas são utilizados com diversas finalidades em eletroanálise, dentre as quais usualmente moléculas com atribuições biológicas são amplamente caracterizadas [164–168].

Neste capítulo serão discutidas as vantagens da utilização de dois materiais nanométricos (nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro) na caracterização e determinação de cefadroxila, e os resultados comparados com o observado com carbono vítreo sem modificação, tanto para a construção da curva analítica quanto para a determinação em cápsulas comerciais de Duracef®. Espectroscopia de impedância

eletroquímica e a microscopia de varredura eletrônica foram utilizadas para a caracterização da superfície modificada.

4.2 Objetivos

- Desenvolver e otimizar eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro;
- Avaliar a contribuição de cada material nanométrico utilizado na resposta eletroquímica referente à oxidação da porção fenólica da cefadroxila;
- Comparar os resultados obtidos com o eletrodo modificado otimizado e o eletrodo sem modificação (resultados descritos no Capítulo 3), referente à determinação de cefadroxila utilizando eletrodo de carbono vítreo;
- Determinar a quantidade de cefadroxila em cápsulas de Duracef[®] com o eletrodo modificado otimizado.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sem prévia purificação. As soluções foram preparadas com água deionizada (18 M Ω cm) obtida com sistema de osmose reversa OS10 LX (Gehaka).

4.3.2 Preparo de soluções

As soluções de eletrólito utilizadas nas medidas voltamétricas (solução tampão fosfato (PB) 0,1 M) foram preparadas a partir da dissolução de massa apropriada de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄) em água

deionizada. O ajuste do pH foi feito com adições de pequeno volume de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6,0 M para valores de pH entre 4,0 e 10.

A solução estoque de cefadroxila 1,00 mM foi preparada por dissolução de massa apropriada do composto em água deionizada e mantida ao abrigo da luz sob 4 °C quando não utilizada.

Nanotubos de carbono de parede múltipla (CNTs) foram funcionalizados por 20 horas em solução concentrada de ácido nítrico (HNO₃) sob agitação rigorosa, conforme descrito [161]. Foram preparadas dispersões de CNTs 0,2 % e 0,5 % (m/v) em dispersões de quitosana 0,5 e 1,0 % (m/v) em solução de ácido acético 1,0% (v/v). Após preparadas, as dispersões foram submetidas a um banho de ultrassom por pelo menos 60 minutos para homogeneização, e mantidas ao abrigo da luz sob 4 °C quando não utilizadas.

Nanopartículas de ouro (AuNP) foram sintetizadas utilizando citrato de sódio como agente redutor e dispersante [169]. Resumidamente, uma solução de cloreto de ouro (III) 0,01% (m/v) foi preparada em água deionizada e aquecida sob agitação até ebulição. A seguir, foi adicionada lentamente uma solução de citrato de sódio 1,0 % (m/v). Após a solução adquirir uma coloração vermelho-sangue, esta foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a fim de precipitar as nanopartículas de ouro. O sobrenadante foi descartado e o restante foi redisperso em 1,0 mL de água deionizada.

4.3.2.1 *Preparo de amostra comercial de cefadroxila*

Quatro cápsulas comerciais de cefadroxila (Duracef[®], Espanha) foram pesadas, homogeneizadas e uma quantidade igual a 20,0 mg foi dissolvida em 25,0 mL de água deionizada e depois filtrada. O precipitado mantido no filtro foi novamente lavado com água por pelo menos 3 vezes. As águas de lavagem foram coletadas e adicionadas à solução filtrada previamente coletada. O volume final da solução estoque de amostra foi de 50,0 mL.

4.3.3 Instrumentação

As medições de pH foram realizadas com o pHmetro modelo 654 e um eletrodo de vidro combinado (Ecotrode Plus, modelo 60262100, Metrohm). As medidas voltamétricas e impedimétricas foram efetuadas utilizando um potenciostato-galvanostato μ -Autolab Tipo III controlado pelo software NOVA para Windows versão 1.11. O ajuste dos espectros de impedância eletroquímica e de seus respectivos circuitos equivalentes foi realizado utilizando o software ZView 3.2 (Scribner Associates Inc., EUA). As medidas espectrofotométricas foram efetuadas em um espectrômetro Shimadzu, modelo UV-3101PC, controlado pelo software UV Solutions.

4.3.4 Célula eletroquímica e sistema de eletrodos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula constituída de um copo de vidro com capacidade volumétrica de 5,0 mL para a solução de eletrólito. Foi utilizado um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos, sendo um eletrodo de carbono vítreo (GCE) de 1,5 mm de diâmetro (área geométrica 0,071 cm²) como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl, KCl_(sat) como eletrodo de referência. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O limite de detecção (LOD) foi estimado como três vezes o desvio padrão do branco dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi estimado como 3,33 vezes o valor do limite de detecção, Apêndice I.

4.3.4.1 Polimento e limpeza do eletrodo de carbono vítreo

A superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi renovada mecanicamente com polimento utilizando “spray” de diamante com tamanho de partícula de 1,0 μ m (Kemet) como material abrasivo em um feltro (Buehler TexMet C) e posteriormente lavada com água deionizada. Foram obtidos voltamogramas cíclicos com o GCE sem modificação em solução

tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, a fim de estabilizar a linha base (parâmetros experimentais: $E_i = 0,0$ V, $E_f = 1,0$ V, velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} , degrau de potencial = 2 mV, 4 ciclos), previamente às medidas realizadas na presença do analito e à construção dos eletrodos modificados.

4.3.4.2 Construção dos eletrodos modificados

Os eletrodos modificados CNT-Chit/GCE foram construídos adicionando $4,0 \mu\text{L}$ (*drop-casting*) de cada dispersão correspondente na superfície do GCE previamente renovado. Após confirmação de que a superfície estava seca (em média 60 minutos em temperatura ambiente) os eletrodos foram empregados para a realização das medidas eletroquímicas. As nanopartículas de ouro sintetizadas foram utilizadas para a construção do eletrodo modificado AuNP/CNT-Chit/GCE, adicionando $4,0 \mu\text{L}$, respectivamente para cada camada (1 a 3) à superfície do eletrodo modificado CNT-Chit/GCE otimizado. Após a confirmação de que a superfície estava seca (em média 30 minutos em temperatura ambiente) os eletrodos foram empregados para a realização das medidas eletroquímicas. A Tabela 4.1 ilustra as designações de cada eletrodo modificado tendo em vista as dispersões e camadas de suspensão de nanopartículas utilizados em sua construção.

Tabela 4.1. Designação dos eletrodos modificados de acordo com sua construção.

Construção	CNT (%)	Quitosana (%)	AuNP (n° de camadas)
CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	0,2	0,5	-
CNT ₂ -Chit ₁ /GCE	0,2	1,0	-
CNT ₅ -Chit ₅ /GCE	0,5	0,5	-
CNT ₅ -Chit ₁ /GCE	0,5	1,0	-
AuNP(1)CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	0,2	0,5	1
AuNP(2)CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	0,2	0,5	2
AuNP(3)CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	0,2	0,5	3

4.3.5 Medidas eletroquímicas

Voltamogramas de pulso diferencial (DPV) foram obtidos para a otimização do eletrodo modificado e caracterização do comportamento do cefadroxila, utilizando 25 mV de amplitude de pulso, 2,5 mV de degrau de potencial e 0,5 s de intervalo entre pulsos resultando em uma velocidade de varredura de 5 mVs⁻¹.

Para caracterizar o sensor otimizado foram obtidos espectros de impedância eletroquímica (EIS) em 0,74 V em soluções contendo concentrações de cefadroxila crescentes em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Os espectros foram obtidos resultados comparados com para cada etapa na da construção do eletrodo modificado afim de avaliar o efeito de cada etapa de modificação nos EIS. A faixa de frequência utilizada foi de 65 kHz a 0,1 Hz, com 10 medições por década e tensão de perturbação de 10 mV.

Microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi utilizada para caracterizar morfológicamente a superfície otimizada do sensor, com ampliações de 50000x e 100000x. As curvas analíticas para a cefadroxila foram construídas utilizando amperogramas obtidos a 0,74 V, após a adição de volumes apropriados de soluções padrão do analito (método de adição de padrão). A determinação de cefadroxila em amostras comerciais também foi realizada nas mesmas condições àquelas usadas para a construção das curvas analíticas.

4.3.6 Medidas espectrofotométricas

Espectros de UV-vis foram obtidos para validar a determinação eletroquímica utilizando o eletrodo modificado final. Todos os espectros de UV-vis foram obtidos em uma faixa entre $200 < \lambda < 350$ nm, em baixa velocidade, 0,2 nm de intervalo de amostragem e 1,0 cm de caminho óptico. O comprimento de onda utilizado para a determinação da amostra comercial foi de 229 nm, utilizando o método da adição de padrão, com adições de 10,0 µL de uma solução estoque 1,00 mM de cefadroxila.

4.4 Resultados e discussão

A caracterização eletroquímica do cefadroxila foi avaliada através de voltamogramas de pulso diferencial, utilizando GCE modificado com nanomateriais de carbono e nanopartículas de ouro (estes comumente empregados em eletroanálise), a fim de analisar a contribuição que essas nanoestruturas poderiam proporcionar ao estudo eletroquímico deste fármaco. O antibiótico β -lactâmico cefadroxila sofre três processos de oxidação em GCE, os quais ocorrem em valores altos de potencial, e podem ser atribuídos à oxidação da porção fenólica ($E_{p1a} = 0,75$ V) e do heteroátomo de enxofre próximo ao anel β -lactâmico em duas etapas com a formação de sulfóxido e sulfona ($E_{p2a} = 1,10$ V e $E_{p3a} = 1,42$ V), Seção 3.4.2 do Capítulo 3 [62]. A caracterização e determinação eletroquímica do cefadroxila utilizando o eletrodo modificado se baseou no primeiro processo de oxidação, tendo em vista que sua magnitude de corrente é superior aos demais processos de oxidação e que este ocorre em valores menos positivos de potencial.

4.4.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado

4.4.1.1 *Otimização da construção do eletrodo modificado*

Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos com os eletrodos modificados com nanotubos de carbono, estes construídos com diferentes proporções de CNTs e quitosana (CNT₂-Chit₅, CNT₂-Chit₁, CNT₅-Chit₅ e CNT₂-Chit₁), em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo 100 μ M de cefadroxila, Figura 4.1.

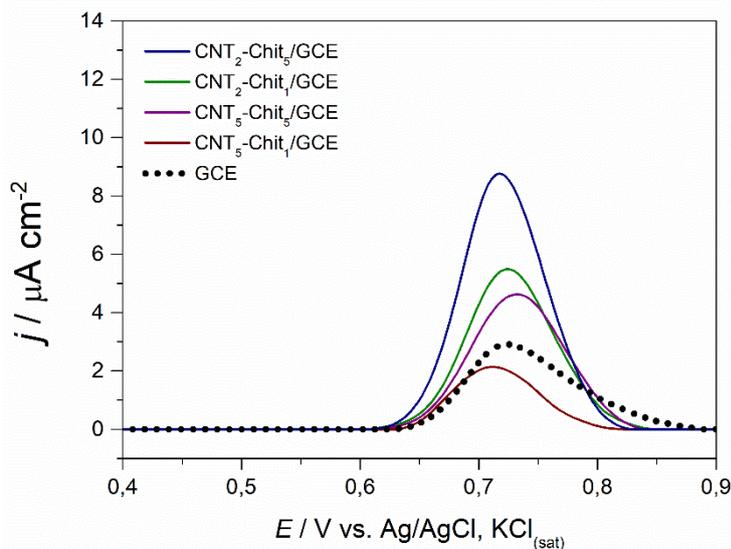


Figura 4.1. Voltamogramas de pulso diferencial utilizando os eletrodos modificados em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.0 contendo 100 μM de cefadroxila, $E_i = 0,0 \text{ V}$, $E_f = 1,0 \text{ V}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Quanto maior a quantidade de CNTs presentes na construção, (0,5 % m/v), menor a magnitude de corrente observada para o processo de oxidação. Usualmente, uma quantidade maior de CNTs proporciona um valor maior de magnitude de corrente, tendo em vista o aumento da área superficial fornecida pelo material nanoestruturado. Ainda assim, a corrente capacitiva observada neste caso foi muito elevada, o que é um indicativo do grau de agregação do material nanoestruturado nesta dispersão em comparação àquela com menor quantidade de CNTs (0,2 % m/v). A agregação em materiais nanoestruturados, devido à diminuição da área superficial e de suas propriedades catalíticas atreladas ao tamanho nanométrico, evita que estes possam contribuir efetivamente para a melhora no sinal eletroquímico, de modo que os valores de corrente se aproximam daqueles observados para o material *bulk*.

Outro parâmetro que interferiu na resposta eletroquímica do eletrodo modificado foi a quantidade de quitosana, utilizada em diferentes concentrações, com a finalidade de

dispersar os CNTs. Este material foi utilizado tendo em vista a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos amina presentes na quitosana, e os grupos carboxílicos superficiais presentes nos CNTs funcionalizados (devido ao pré-tratamento em ácido nítrico) [170]. Em quantidades menores de CNTs (0,2% m/v), uma menor quantidade de quitosana (0,5 % m/v) promoveu a antecipação sutil do potencial de pico e um aumento na magnitude da corrente do processo de oxidação avaliado, ao contrário do observado com maiores quantidades de quitosana. Além de evitar a agregação dos CNTs, a quitosana apresenta também um elevado número de grupos oxigenados, o que possivelmente dificulta a aproximação das moléculas de cefadroxila da superfície do eletrodo modificado. Em relação às dispersões com maior porcentagem de nanotubos de carbono (0,5% m/v), a quantidade de quitosana não apenas interferiu na magnitude da corrente, mas também no potencial de pico, que passou ligeiramente para valores mais positivos. Novamente, esse resultado pode ser atribuído a ineficiência em uma menor concentração de quitosana em dispersar uma quantidade maior de nanotubos de carbono.

A magnitude da corrente para o processo de oxidação do cefadroxila utilizando o eletrodo modificado CNT₂-Chit₅/GCE foi três vezes superior em comparação ao eletrodo sem modificação ($I_p = 8,9 \mu\text{A cm}^{-2}$ e $I_p = 2,0 \mu\text{A cm}^{-2}$). Além disso, como previamente ilustrado no Capítulo 3, a presença dos subprodutos derivados do catecol e do resorcinol, advindos de reações químicas acopladas do produto do primeiro processo de oxidação com água, adsorviam na superfície eletródica e impediam o processo de oxidação em ciclos subsequentes. Neste caso, com o eletrodo modificado com nanotubos de carbono, a diminuição da corrente com o número de voltamogramas registrados foi menos pronunciada, possivelmente devido ao aumento de área eletroativa disponível, ainda que, após um determinado número de medidas, a interferência no sinal analítico foi inevitável.

Dado que a incorporação de nanopartículas de ouro no eletrodo modificado CNT₂-Chit₅/GCE modificado poderia ser vantajosa a fim de minimizar a adsorção desses derivados da quinona e permitir maior sensibilidade na construção da curva analítica, voltamogramas de pulso diferenciais foram obtidos utilizando um eletrodo modificado AuNP/CNT₂ - Chit₅/GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo 100 μM de cefadroxila, Figura 4.2, no qual um número diferente de camadas de nanopartículas de ouro (1, 2 e 3 camadas) foi empregado.

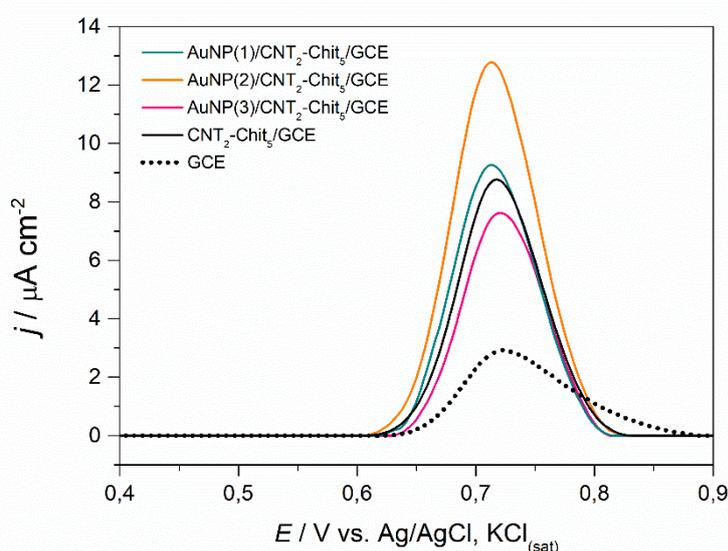


Figura 4.2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo modificado AuNP/CNT₂-Chit₅/GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.0 contendo 100 μM de cefadroxila, $E_i = 0,0 \text{ V}$, $E_f = 1,0 \text{ V}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A incorporação de nanopartículas de ouro para a construção do eletrodo modificado melhorou o sinal analítico observado para o processo de oxidação do cefadroxila em 47 % e 342% em comparação com o eletrodo modificado CNT₂-Chit₅/GCE e o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, respectivamente. Acredita-se que o fator responsável pelo aumento da magnitude da corrente seja causado por um efeito sinérgico entre o aumento da área superficial decorrente da incorporação dos nanotubos de carbono, adicionado à contribuição

catalítica inerente às nanopartículas de ouro. No entanto, as construções que exibiram maior número de camadas de nanopartículas de ouro (> 2 camadas) não proporcionaram uma melhoria do sinal analítico, e influenciaram negativamente o sinal em concentrações mais baixas, devido à presença de uma corrente de fundo mais alta.

O eletrodo modificado que apresentou maior sensibilidade para o primeiro processo de oxidação do cefadroxila (AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/CCE) foi construído com 2 camadas de nanopartículas de ouro. Além disso, a magnitude da corrente nas medições subsequentes se mantém constante (dados não ilustrados), o que pode ser atribuído à diminuição da adsorção dos subprodutos gerados, tendo em vista a característica estrutural da superfície disponível em comparação as modificações avaliadas anteriormente.

4.4.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A influência de cada material nanoestruturado na resistência à transferência de carga para a oxidação do cefadroxila foi avaliada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) utilizando concentrações crescentes de cefadroxila (50, 100 e 200 µM). Os espectros de impedância foram registrados em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 a 0,74 V vs. SCE utilizando os eletrodos modificados CNT₂-Chit₅/GCE e AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE e o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, Figura 4.3A.

Os espectros de impedância contêm um semicírculo na região de altas frequências, linearidade na região de frequências intermediárias e pseudo-linearidade na região de baixas frequências, os quais correspondem ao processo de transferência de carga na interface eletrodo/solução, processo de difusão através do filme e transferência de carga na interface CNT-Chit/eletrodo, respectivamente. Os espectros foram ajustados ao circuito elétrico equivalente, Figura 4.3B, e correspondem à resistência da solução (R_s) em série com um componente paralelo envolvendo a resistência à transferência de carga (R_{ct}) e a capacitância

da dupla camada, modelada através do elemento de fase constante (CPE_{dl}), em que $CPE = -1/(C\omega)^\alpha$, nas regiões de alta frequência do espectro.

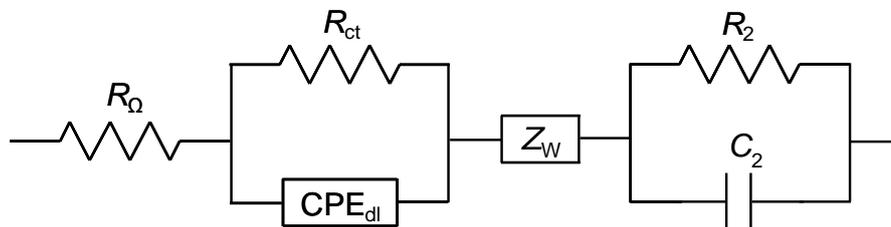
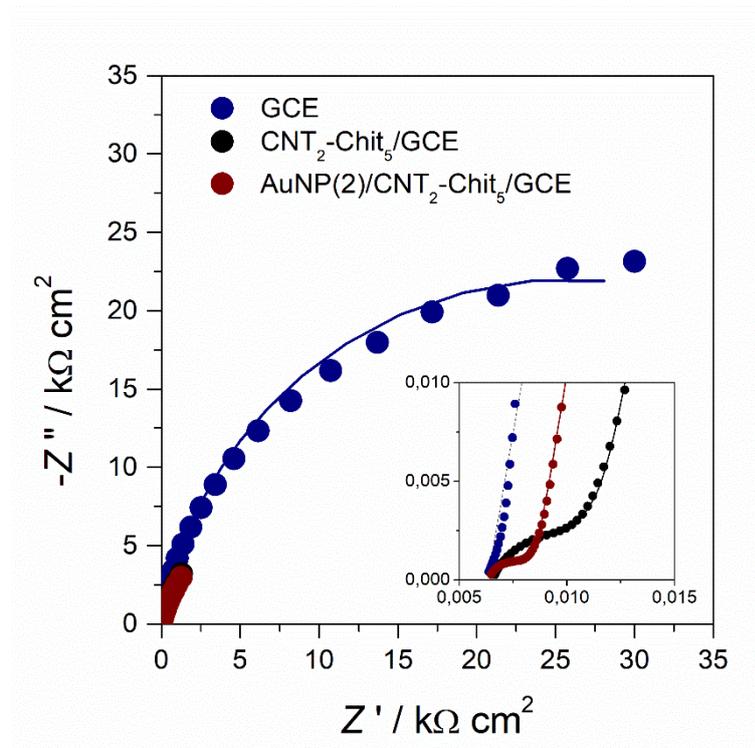


Figura 4.3. (A) Espectros de impedância eletroquímica obtidos utilizando os eletrodos modificados e o eletrodo sem modificação em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.0 contendo 100 μ M cefadroxila a um potencial aplicado de 0,74 V. (B) Circuito equivalente.

Nos eletrodos modificados, atrelado em série se encontra a impedância de difusão Warburg (Z_w) para a região de frequências intermediárias, expressada por $Z_w = R_D \text{cth}[(\tau i\omega)^\alpha](\tau i\omega)^{-\alpha}$, em que $\alpha < 0.5$, τ é a constante de tempo difusional e R_D a resistência à difusão, em série conectado com um componente paralelo envolvendo a resistência a transferência de carga na interface CNT-Chit/GCE (R_2) e a capacitância (C_2),

pertencentes a região de baixa frequência. Os valores obtidos com o ajuste dos espectros estão ilustrados na Tabela 4.2 em relação a cada modificação em uma solução contendo 50, 100 e 250 μM de cefadroxila.

Tabela 4.2. Parâmetros referentes aos espectros de impedância eletroquímica obtidos através dos circuitos equivalentes para cada modificação.

Electrodo	[Cefadroxila] / μM	R_{Ω} / $\Omega \text{ cm}^2$	R_{ct} / $\Omega \text{ cm}^2$	CPE_{dl} / $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$	α_{dl}	Z_w / $\Omega \text{ cm}^2$	τ / ms	α_z	R_2 / $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$	C_2 / mF cm^{-2}
GCE	50	6,5	60,3	23,3	0,93	--	--	--	--	--
	100	6,5	46,2	22,9	0,93	--	--	--	--	--
	250	6,6	29,0	22,8	0,93	--	--	--	--	--
CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	50	6,0	1,23	60,1	1,0*	11,2	4,6	0,43	4,42	0,73
	100	6,2	1,31	58,7	1,0*	11,5	4,2	0,43	2,41	0,85
	250	6,2	1,45	56,1	1,0*	10,9	3,9	0,43	1,71	0,77
AuNP(2)/CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	50	6,3	0,73	26,3	1,0*	4,54	1,3	0,44	1,12	1,35
	100	6,2	0,77	25,3	1,0*	4,40	1,3	0,44	1,10	1,10
	250	6,3	0,84	24,4	1,0*	4,22	1,3	0,44	1,05	0,88

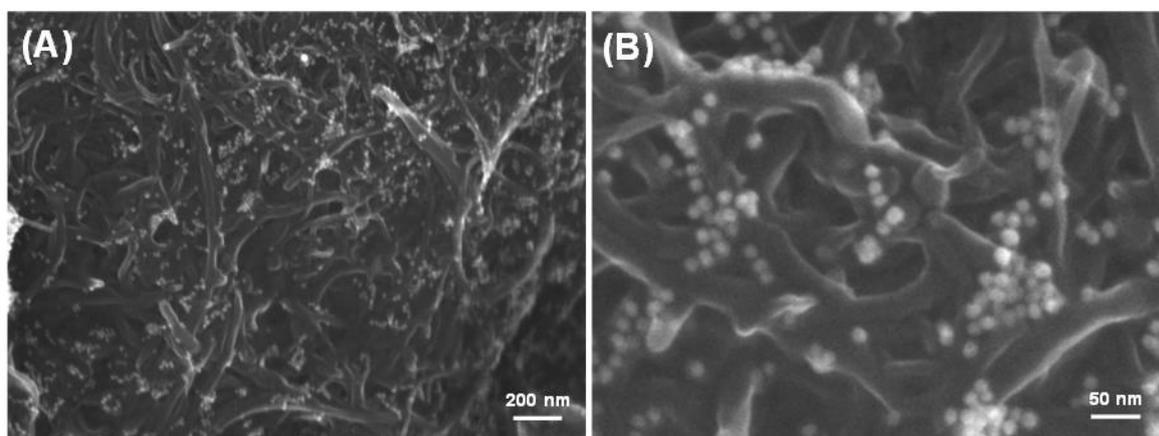
Há uma diminuição nos valores de R_{ct} (controle da cinética de transferência de carga) com a incorporação de cada material nanoestruturado, como previsto, com valores de 0,773 $\Omega \text{ cm}^{-2}$ para o eletrodo modificado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE, 1,31 $\Omega \text{ cm}^{-2}$ para o CNT₂-Chit₅/GCE e 46,2 $\Omega \text{ cm}^{-2}$ para o GCE sem modificação. Além disso, ao passo que os valores decrescem sutilmente nos eletrodos modificados com o aumento da concentração de cefadroxila, o contrário é observado para o GCE sem modificação, cujos valores decrescem substancialmente, possivelmente devido à limitação da área superficial disponível. A capacitância interfacial é muito superior após a modificação com os CNTs, porém, com a

incorporação das AuNP, tal valor decresce novamente, ilustrando que a utilização desta segunda camada nanoestruturada reduz o efeito de separação de carga.

Com respeito ao elemento de difusão Warburg, as AuNP facilitam a difusão e reduzem a constante de tempo de difusão, além de promoverem uma diminuição na resistência a transferência de carga na interface eletrodo/solução, dependente da concentração de cefadroxila somente com CNT e sem AuNP. Todas estas interpretações estão de acordo com os dados voltamétricos previamente ilustrados.

4.4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia superficial do eletrodo modificado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE foi avaliada por microscopia de varredura eletrônica, Figura 4.4A e Figura 4.4B, com dois valores de ampliação distintos, 50000x e 100000x, respectivamente. Nestas imagens está presente a rede de nanotubos de carbono, na qual as nanopartículas de ouro estão claramente ancoradas em sua estrutura cilíndrica. Elas apresentam forma esférica em sua maioria, estão altamente dispersas e apresentam um diâmetro médio de $15,1 \pm 1,7$ nm, de acordo com o histograma apresentado na Figura 4.4C, no qual 200 nanopartículas foram analisadas com o software de análise de partículas *ImageJ*. Além disso, elas aparentemente recobrem uma grande área de nanotubos de carbono, garantindo uma arquitetura muito mais homogênea para o estudo eletroquímico do fármaco, fato este importante em eletroanálise.



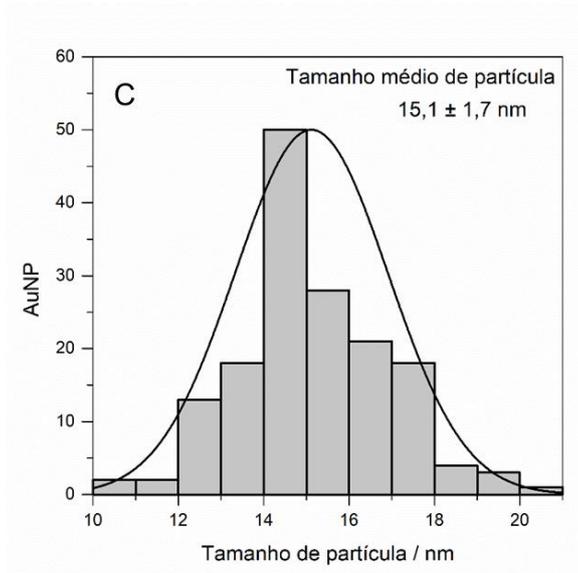


Figura 4.4. Imagem de microscopia eletrônica de varredura referente à morfologia e distribuição de nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, com ampliação de 50.000x (A) e 100.000x (B) e Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (C).

4.4.2 Comportamento eletroquímico do cefadroxila no eletrodo modificado

O comportamento eletroquímico do cefadroxila também foi avaliado em solução tampão fosfato 0,1 M em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0, Figura 4.5.

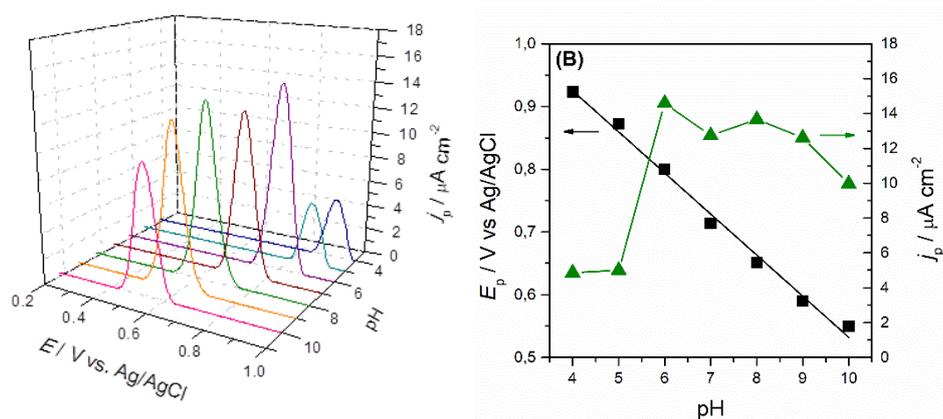


Figura 4.5. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo modificado AuNP/CNT₂-Chit₅/GCE em solução tampão fosfato 0,1 M em valores distintos de pH na faixa de 4,0 a 10,0, contendo 100 µM de cefadroxila (A). Gráficos de potencial de pico, E_p , e magnitude de corrente, I_p vs. pH obtidos através de voltamogramas de pulso diferencial (B).

Dado que a inclinação da curva E_p vs. pH obtida foi de -65 mV, equação (4.1), este resultado é semelhante ao obtido em GCE sem modificação, Seção 3.4.1 do Capítulo 3, no qual o número de prótons obtido é igual ao número de elétrons. Ainda assim, em valores baixos de pH, a magnitude da corrente para o processo de oxidação foi menor do que o esperado, em comparação com os resultados obtidos com o GCE sem modificação.

$$E_{p1a} / V = 0.118 - 0.065 \text{ pH}, R^2 = 0.992 \quad (4.1)$$

Isto pode ser atribuído à presença do sal de citrato de sódio, utilizado com a finalidade de evitar a agregação das nanopartículas de ouro que, em valores inferiores de pH, não se encontram carregados negativamente, e são ineficientes em promover a repulsão entre as nanopartículas, diminuindo então a magnitude do sinal analítico. Em valores intermediários de pH, a magnitude de corrente atinge um valor máximo, confirmando os resultados obtidos na otimização do eletrodo modificado. O valor de $W_{1/2}$ obtido em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foi de 89 mV, mais próximo do valor teórico, Seção 1.2 do Capítulo 1, do que o valor obtido em GCE sem modificação (107 mV), indicativo de que a reação de transferência de carga entre cefadroxila e a superfície do eletrodo modificada AuNP(2)/CNT-Chit/GCE foi aprimorada. Estes dados estão de acordo com a caracterização eletroquímica já descrita anteriormente, Seção 3.4.1 do Capítulo 3.

4.4.3 Determinação eletroquímica de cefadroxila

4.4.3.1 Construção da curva analítica

Tendo em vista o aumento de sensibilidade obtido com a utilização do eletrodo modificado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE na determinação de uma concentração fixa de cefadroxila em comparação às demais arquiteturas avaliadas, este eletrodo foi utilizado primeiramente na construção de uma curva analítica utilizando voltametria de pulso diferencial, nas mesmas condições usadas com o eletrodo de carbono vítreo sem

modificação, previamente ilustrados na Seção 3.4.4. do Capítulo 3. Observou-se que a alta corrente de fundo presente nas medidas conduzidas com o eletrodo modificado impedia a detecção da corrente em baixas concentrações de cefadroxila ($< 5,0 \mu\text{M}$). Além disso, as AuNP sofriam oxidação tendo em vista a faixa de potencial em que os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados ($E_f = 1,0 \text{ V}$), comprometendo a arquitetura desenvolvida e propagando erros na construção da curva analítica. Para evitar o uso de polímeros (como Nafion[®]), que poderiam afetar a modificação e interferir na difusão das moléculas de cefadroxila em direção à superfície do eletrodo (dada sua natureza negativa, tipicamente exclusão por carga), a técnica utilizada para a determinação de cefadroxila foi alterada a fim de evitar estes problemas.

Utilizou-se então a técnica amperométrica que se baseiam-se na aplicação de um potencial fixo e detecção da corrente ao longo do tempo. Amperogramas foram então obtidos, utilizando os eletrodos modificados AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE e CNT₂-Chit₅/GCE e o eletrodo de carbono vítreo sem modificação modificado, em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 sob potencial aplicado de 0,74 V, com concentração crescente de cefadroxila na faixa de 2,0 a 60 μM . As curvas analíticas, Figura 4.6, para cada modificação foram analisadas e os dados compilados na Tabela 4.3.

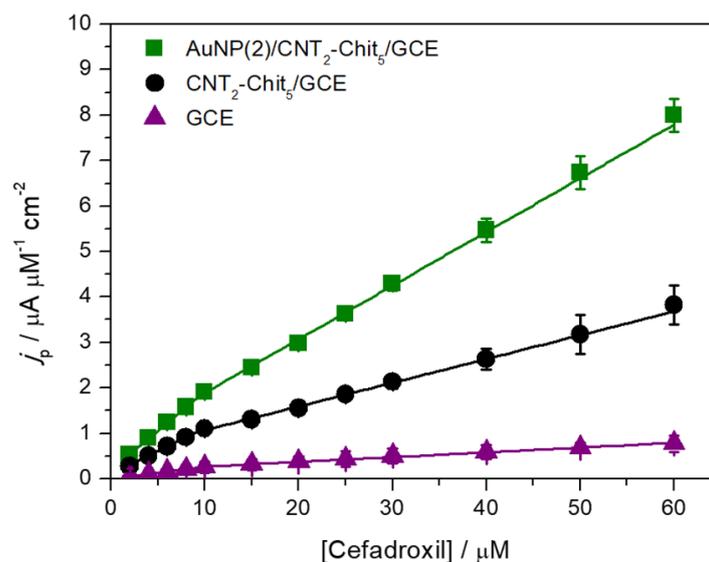


Figura 4.6. Curvas analíticas construídas utilizando os amperogramas obtidos em 0,74 V com os eletrodos modificados e sem modificação em solução tampão fosfato 0,1 M PBS pH 7.0 contendo concentrações crescentes de cefadroxila na faixa de 2,0 μM a 60 μM .

De acordo com as curvas analíticas, observam-se duas regiões lineares distintas na faixa de concentração estudada, entre 2,0 a 10 μM e 10 a 60 μM , respectivamente. Esta quebra na linearidade pode ser atribuída à formação de uma subcamada de produtos adsorvidos do processo de oxidação [171]. Comparando os valores obtidos para os dois segmentos lineares, o valor de sensibilidade obtido para o eletrodo modificado otimizado foi superior àqueles obtidos com o eletrodo modificado CNT₂-Chit₅/GCE e o GCE não modificado. Isto mostrou que as modificações utilizadas estão evitando ou pelo menos diminuindo, a quantidade do produto de oxidação do analito na superfície dos eletrodos. Com isso, não há uma perda tão substancial do sinal analítico.

Embora a voltametria de pulso diferencial seja geralmente superior em termos de sensibilidade quando comparada a outras técnicas eletroquímicas, os valores obtidos para o limite de detecção de cefadroxila foram inferiores para as medidas amperométricas realizadas com a utilização do eletrodo modificado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE.

Tabela 4.3. Valores obtidos a partir das curvas analíticas descritas na Figura 4.6.

Configuração	Faixa Linear (μM)	LoD (μM)	LoQ (μM)	S (μA / μM cm ²)	R ²
GCE	2,00 – 10,0	0,780	2,60	0,0252 ± 0,0005	0,998
	10,0 – 60,0	4,02	13,4	0,0102 ± 0,0006	0,994
CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	2,00 – 10,0	0,500	1,67	0,103 ± 0,003	0,997
	10,0 – 60,0	2,45	8,16	0,0542 ± 0,002	0,997
AuNP(2)/CNT ₂ -Chit ₅ /GCE	2,00 – 10,0	0,220	0,730	0,176 ± 0,002	0,999
	10,0 – 60,0	1,26	4,20	0,123 ± 0,002	0,999

Sua sensibilidade foi 700% maior que a observada com eletrodo de carbono vítreo sem modificação na faixa de concentração de 2,0 a 10 μM de cefadroxila (utilizando amperometria) e 65% maior do que a observada com o mesmo eletrodo, na faixa de 1,0 a 5,0 μM (utilizando voltametria de pulso diferencial, Seção 3.4.4 do Capítulo 3). Dada a possibilidade de construir uma curva analítica para a determinação de cefadroxila com alta sensibilidade e baixo limite de detecção utilizando o sensor desenvolvido, este método foi então aplicado na determinação do antibiótico em amostras de cápsulas comerciais do Duracef®.

4.4.3.2 Análise em amostras de cápsulas comerciais

Para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido, a determinação em cápsulas comerciais de Duracef® do princípio ativo (cefadroxila) foi conduzida utilizando o eletrodo modificado otimizado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 por amperometria em um valor de potencial fixo de 0,74 V, pelo método de adição padrão. Os valores de recuperação calculados a partir da adição de uma solução padrão de cefadroxila foram superiores a 95% para a faixa linear de concentração estudada (2,0 a 10 μM), indicando também que o método utilizado é eficiente na determinação de cefadroxila na matriz da cápsula.

Tabela 4.4. Dados obtidos para a determinação do princípio ativo em cápsulas comerciais de Duracef® de amperogramas registrados com potencial aplicado de 0,74 V utilizando o eletrodo modificado AuNP(2)/CNT₂-Chit₅/GCE (*n* = 3).

Amostra	Especificado / μM	Adicionado / μM	Encontrado / μM	Recuperado / %	RSD / %
Cefadroxila®	2,00	0,00	2,02	101,1	1,9
	2,00	2,00	4,02	100,4	2,3
	2,00	4,00	6,08	101,4	1,7
	2,00	6,00	7,77	97,1	1,5
	2,00	8,00	9,60	96,0	1,7

De acordo com os valores obtidos para esta determinação utilizando amperometria (todas realizadas em triplicata e listadas na Tabela 4.4), foi possível estimar uma quantidade de $5,2 \cdot 10^2 \pm 0,1 \cdot 10^2$ mg para cada cápsula, valor superior ao especificado pelo produtor, mas dentro da margem de erro indicada. Esses valores foram validados com medidas espectroscópicas (UV-vis), nas quais foram estimadas $5,19 \cdot 10^2 \pm 0,09 \cdot 10^2$ mg para cada cápsula (dados não ilustrados).

4.5 Conclusões

A caracterização eletroquímica de cefadroxila foi realizada utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (funcionalizados com ácido nítrico concentrado e dispersos em quitosana) e nanopartículas de ouro (com aproximadamente 15 nm de tamanho de partícula). As nanopartículas de ouro foram sintetizadas em solução 1,0 % (m/v) de citrato de sódio e redispersas em água após centrifugação. O eletrodo modificado otimizado foi preparado utilizando *drop-casting* de 4 μL de uma suspensão 0,2 % (m/v) de CNTs dispersos em 1,0 % (v/v) de ácido acético contendo 0,5 % (m/v) de quitosana, seguido de 2 camadas de dispersão de nanopartículas de ouro (4 μL cada camada).

A oxidação da porção fenol do cefadroxila na superfície modificada ocorreu em um valor potencial ligeiramente menos positivo ($E_p = 0,731$ V) e com maior magnitude de corrente (300%) em comparação com o eletrodo de carbono vítreo ($E_p = 0,740$ V) sem modificação. A superfície modificada, foi também caracterizada utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica, apresentando valores mais baixos de resistência à transferência de carga para a oxidação do cefadroxila. A construção da curva analítica foi realizada por amperometria com potencial aplicado de 0,74 V, utilizando o método da adição de padrão. Os limites estimados de detecção e quantificação foram de 0,222 μ M e 0,739 μ M, respectivamente. A determinação de cefadroxila em amostras comerciais de Duracef[®] apresentou altos valores de recuperação para cada adição de padrão e a quantidade do medicamento em cada cápsula foi concordante com o valor especificado com o fabricante. O método proposto foi validado utilizando espectroscopia UV-vis.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de ensaios *in vitro* a fim de obter os valores de IC₅₀ referentes aos antichagásicos em estudo (*p*-NSF e *m*-NSF), e, então, confirmar a atividade biológica prevista com a caracterização voltamétrica realizada;
- Avaliar a interação entre os candidatos antichagásicos, as bases nitrogenadas purínicas, pirimidínicas e DNA, a fim de constatar o dano oxidativo promovido pelos bioisómeros após incubação em soluções de DNA e com condicionamento de potencial para a geração *in situ* do nitro ânion radical;
- Utilização do efeito de complexação de cefadroxila e amoxicilina com Cu(II) e outros metais para determinação eletroquímica simultânea de ambos os antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Editio, Wiley, 2000.
- [2] C. Brett, A. Brett, *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Springer. (1993) 427.
- [3] H.H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*, 2004. doi:10.1201/9781439807842.
- [4] A. Amine, H. Mohammadi, Amperometry, in: *Encycl. Anal. Sci.*, Elsevier, 2019: pp. 85–98. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14204-0.
- [5] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M.Á. Ferro-García, G. Prados-Joya, R. Ocampo-Pérez, Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review, *Chemosphere*. 93 (2013) 1268–1287. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.07.059.
- [6] Z. Yang, A. Gonzalez-Cortes, G. Jourquin, J.C. Viré, J.M. Kauffmann, J.L. Delplancke, Analytical application of self assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 789–795. doi:10.1016/0956-5663(95)99217-9.
- [7] P.J. Hotez, D.H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S.E. Sachs, J.D. Sachs, L. Savioli, Control of Neglected Tropical Diseases, *N. Engl. J. Med.* 10 (2007) 1018–1027.
- [8] P. Chirac, E. Torreele, Global framework on essential health R&D, *Lancet*. 367 (2006) 1560–1561. doi:10.1016/S0140-6736(06)68672-8.
- [9] Hotez, P.J., Pecoul, B., “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases, *Neglected Tropical Diseases* (2010) 1–9.
- [10] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M.G.G. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C.R. Machado, S.G. Andrade, N.R. Sturm, The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.
- [11] S. Aldo, C. Valente, H.F. Neto, Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94 (1999) 395–398.
- [12] J.P. Dias, S. Brener, Chagas’ disease and blood transfusion, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 79 (1984) 139–147.
- [13] M.C. Vinhaes, J.C. Dias, Chagas disease in Brazil, *Cad. Saúde Pública / Ministério Da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saúde Pública*. 16 Suppl 2 (2000) 7–12. doi:10.1038/153678d0.
- [14] S.L. Croft, M.P. Barrett, J.A. Urbina, Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis, *Trends Parasitol.* 21 (2005) 508–512.
- [15] S. Rath, L.A. Trivelin, T.R. Imbrunito, D.M. Tomazela, M.N. De Jesús, C. Marzal, I. De Medicina, T. De São, U.D.S. Paulo, A. Enéas, D.C. Aguiar, S.P. Sp, L. Augusto Trivelin, T.R. Imbrunito, D.M. Tomazela, M.N. De Jesús, P. Calvo Marzal, H.F. De Andrade, A. Gustavo Tempone, Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte, *Quim. Nova*. 26 (2003) 550–555. doi:10.1590/S0100-40422003000400018.
- [16] J. Cazzuli, V. Stoka, V. Turk, J. Cazzulo, V. Stoka, V. Turk, The Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A Valid Target for Chemotherapy of Chagas

- Disease, *Curr. Pharm. Des.* 7 (2005) 1143–1156. doi:10.2174/1381612013397528.
- [17] C. écile E. Viodé, N. Bettache, N. Cenas, R.L.L. Krauth-Siegel, G. érard E. Chauvière, N. Bakalara, J. Périé, Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 549–557. doi:10.1016/S0006-2952(98)00324-4.
- [18] R.L. Krauth-Siegel, O. Inhoff, Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule, *Parasitol. Res.* 90 (2003) 77–85.
- [19] F.R. Paula, S.H.P. Serrano, L.C. Tavares, Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos, *Quim. Nova.* 32 (2009) 1013–1020. doi:10.1590/s0100-40422009000400032.
- [20] M.C. Jockers-Scherübl, R.H. Schirmer, R.L. Krauth-Siegel, Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds., *Eur. J. Biochem.* 180 (1989) 267–272.
- [21] J.R. Coura, J. Borges-Pereira, Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45 (2012) 286–296.
- [22] A. Zahoor, M.V.M.M. Lafleur, R.C. Knight, H. Loman, D.I. Edwards, DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 3299–3304. doi:10.1016/0006-2952(87)90648-4.
- [23] J.H. Tocher, Reductive activation of nitroheterocyclic compounds, *Gen. Pharmacol.* 28 (1997) 485–487. doi:10.1016/S0306-3623(96)00283-2.
- [24] F.C. de Abreu, P.A. de L. Ferraz, M.O.F. Goulart, Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 19–35. doi:10.1590/S0103-50532002000100004.
- [25] J.A. Squella, L.J. Núñez-Vergara, A. Campero, J. Maraver, P. Jara-Ulloa, J. Carbajo, Electrochemical Reduction of 2-Nitroimidazole in Aqueous Mixed Medium, *J. Electrochem. Soc.* 154 (2007) F77. doi:10.1149/1.2472553.
- [26] H. Cerecetto, B. Mester, S. Onetto, G. Seoane, M. González, F. Zinola, Formal potentials of new analogues of nifurtimox: relationship to activity., *Farmacol.* 47 (1992) 1207–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1300126> (accessed February 15, 2020).
- [27] C. Boga, M. Calvaresi, P. Franchi, M. Lucarini, S. Fazzini, D. Spinelli, D. Tonelli, Electron reduction processes of nitrothiophenes. A systematic approach by DFT computations, cyclic voltammetry and E-ESR spectroscopy, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 7986–7995. doi:10.1039/c2ob26128f.
- [28] S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, C. Martinez, G. Chauviere, J. Périé, J.A. Squella, Voltammetric study of nitro radical anion generated from some nitrofuran compounds of pharmacological significance, *Electroanalysis.* 15 (2003) 19–25. doi:10.1002/elan.200390000.
- [29] S. Bollo, S. Gunckel, L.J. Núñez-Vergara, G. Chauviere, J.A. Squella, Electrochemical study of 4-substituted analogues of megalzol, *Electroanalysis.* 17 (2005) 134–139. doi:10.1002/elan.200403063.
- [30] C. Yañez, J. Pezoa, M. Rodríguez, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella, Voltammetric Behavior of a 4-Nitroimidazole Derivative, *J. Electrochem. Soc.* 152 (2005) J46. doi:10.1149/1.1904983.
- [31] J. Argüello, S. Bollo, J.A. Squella, Nitro radical anion formation from nitrofuryl substituted 1, 4-dihydropyridine derivatives in mixed and non-aqueous media, 69 (2006) 104–112. doi:10.1016/j.bioelechem.2005.12.003.
- [32] U.A. Boelsterli, H.K. Ho, S. Zhou, K.Y. Leow, Bioactivation and Hepatotoxicity of Nitroaromatic Drugs, (2006) 715–727.
- [33] Y. Ni, P. Wang, S. Kokot, Voltammetric investigation of DNA damage induced by

- nitrofurazone and short-lived nitro-radicals with the use of an electrochemical DNA biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 245–251. doi:10.1016/j.bios.2012.05.034.
- [34] J. Rodríguez, A. Gerpe, G. Aguirre, U. Kemmerling, O.E. Piro, V.J. Arán, J.D. Maya, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto, Study of 5-nitroindazoles' anti-Trypanosoma cruzi mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1545–1553. doi:10.1016/j.ejmech.2008.07.018.
- [35] N. Karikalán, S. Kubendhiran, S. Chen, P. Sundaresan, Electrocatalytic reduction of nitroaromatic compounds by activated graphite sheets in the presence of atmospheric oxygen molecules, *J. Catal.* 356 (2017) 43–52. doi:10.1016/j.jcat.2017.09.012.
- [36] M. Gál, R. Sokolová, V. Kolivoška, A. Morovská Turoňová, M. Ambrová, J. Híveš, Metronidazole radical anion formation studied by means of electrochemical impedance spectroscopy, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 76 (2011) 1607–1617. doi:10.1135/cccc2011113.
- [37] M.A. La-Scala, S.H.P. Serrano, I.G.R. Gutz, Voltammetric Behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes, *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (1999) 127–135. doi:10.1590/S0103-50531999000200010.
- [38] M.A. La-Scala, G.H.G. Trossini, C.M.S. Menezes, M.C. Chung, E.I. Ferreira, Electrochemical Reduction Using Glassy Carbon Electrode in Aqueous Medium of a Potential Anti-Chagas Drug: NFOH, *J. Electrochem. Soc.* 156 (2009) F93. doi:10.1149/1.3130082.
- [39] M.S. d. S. Julião, E.I. Ferreira, N.G. Ferreira, S.H.P. Serrano, Voltammetric detection of the interactions between RNO₂{radical dot}- and electron acceptors in aqueous medium at highly boron doped diamond electrode (HBDDE), *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 5080–5086. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.054.
- [40] M.S. da S. Julião, É.C. Almeida, M.A. La Scala, N.G. Ferreira, R.G. Compton, S.H.P. Serrano, Voltammetric behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode, *Electroanalysis.* 17 (2005) 269–274.
- [41] D.C. Tiwari, R. Jain, S. Sharma, Electrochemically deposited polyaniline/polypyrrole polymer film modified electrodes for determination of furazolidone drug, *J. Sci. Ind. Res. (India).* 66 (2007). <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/1347> (accessed February 15, 2020).
- [42] I. Murueva, J. Romero, C. Espinosa-bustos, electrochemical studies of new 5- and 6-nitro N -acyl-1 H -indazoles, (2011). doi:10.1002/poc.1843.
- [43] C. Rodrigues, A.A. Batista, R.Q. Aucélio, L.R. Teixeira, C. Visentin, H. Beraldo, Spectral and electrochemical studies of ruthenium (II) complexes with N 4 -methyl-4-nitrobenzaldehyde and N 4 -methyl-4-nitrobenzophenone thiosemicarbazone : Potential anti-trypanosomal agents, 27 (2008) 3061–3066. doi:10.1016/j.poly.2008.06.002.
- [44] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, H. Cerecetto, R. Maio, M. Gonzalez, W. Porcal, A. Morello, Y. Repetto, J. Maya, Novel Benzo[1,2-c]1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies, *Lett. Drug Des. Discov.* 2 (2005) 294–301. doi:10.2174/1570180054038341.
- [45] L.J. Núñez-Vergara, F. García, M.M. Domínguez, J. de la Fuente, J.A. Squella, In situ reactivity of the electrochemically generated nitro radical anion from nitrendipine with glutathione, adenine and uracil, *J. Electroanal. Chem.* 381 (1995) 215–219. doi:10.1016/0022-0728(94)03647-L.
- [46] R.C. Santra, D. Ganguly, J. Singh, K. Mukhopadhyay, S. Das, A study on the formation of the nitro radical anion by ornidazole and its significant decrease in a structurally characterized binuclear Cu(II)-complex: Impact in biology, *Dalt. Trans.*

- 44 (2015) 1992–2000. doi:10.1039/c4dt03362k.
- [47] L.J. Núñez-Vergara, M.E. Ortiz, S. Bollo, J.A. Squella, Electrochemical generation and reactivity of free radical redox intermediates from ortho- and meta-nitro substituted 1,4-dihydropyridines, *Chem. Biol. Interact.* 106 (1997) 1–14. doi:10.1016/S0009-2797(97)00050-1.
- [48] L. Fotouhi, E. Kohestanian, M.M. Heravi, The effect of metal ions on the electrochemistry of the furazolidone, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 565–570. doi:10.1016/j.elecom.2006.02.004.
- [49] J.H. Tocher, D.I. Edwards, Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 1089–1094. doi:10.1016/0006-2952(94)90144-9.
- [50] X. Jiang, X. Lin, Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications, *Bioelectrochemistry.* 68 (2006) 206–212. doi:10.1016/j.bioelechem.2005.08.003.
- [51] M. Catalán, A. Álvarez-Lueje, S. Bollo, Electrochemistry of interaction of 2-(2-nitrophenyl)-benzimidazole derivatives with DNA, *Bioelectrochemistry.* 79 (2010) 162–167. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.02.002.
- [52] T. Andres, L. Eckmann, D.K. Smith, Voltammetry of nitrobenzene with cysteine and other acids in DMSO. Implications for the biological reactivity of reduced nitroaromatics with thiols, *Electrochim. Acta.* 92 (2013) 257–268. doi:10.1016/j.electacta.2013.01.047.
- [53] P. Nandy, S. Das, *Inorganica Chimica Acta* In situ reactivity of electrochemically generated nitro radical anion on Ornidazole and its monomeric Cu (II) complex with nucleic acid bases and calf thymus DNA, *Inorganica Chim. Acta.* 501 (2020) 119267. doi:10.1016/j.ica.2019.119267.
- [54] A.H. Klahn, M. Fuentealba, D. Sierra, C. Olea-azar, J.D. Maya, M.E. Medina, Ferrocenyl and cyrhetrenyl azines containing a 5-nitroheterocyclic moiety : Synthesis , structural characterization , electrochemistry and evaluation as anti- Trypanosoma cruzi agents, 839 (2017) 108–115. doi:10.1016/j.jorganchem.2017.03.014.
- [55] R. Augusto, M. Serafim, Antichagásicos potenciales: síntese e modelagem molecular e híbridos de hidrazonas e liberadores de óxido nítrico, 2016.
- [56] N.D. Segretti, R.A.M. Serafim, M.C.F. Segretti, M. Miyata, F.R. Coelho, O. Augusto, E.I. Ferreira, New antibacterial agents: Hybrid bioisoster derivatives as potential E. coli FabH inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 3988–3993. doi:10.1016/j.bmcl.2016.06.089.
- [57] M.D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K.M. Miranda, C. Switzer, J.M. Fukuto, P.J. Farmer, D.A. Wink, K.N. Houk, The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry, *PNAS*, 2002. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162095599 (accessed October 19, 2019).
- [58] R.A. Massarico Serafim, J.E. Gonçalves, F.P. De Souza, A.P. De Melo Loureiro, S. Storpirtis, R. Krogh, A.D. Andricopulo, L.C. Dias, E.I. Ferreira, Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity, *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) 418–425. doi:10.1016/j.ejmech.2014.05.077.
- [59] W.W. Schoeller, J. Niemann, P. Rademacher, On the electrochemical oxidation of enamines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1988) 369–373. doi:10.1039/P29880000369.
- [60] A. Kuhn, K.G. Eschwege, J. Conradie, Reduction potentials of para-substituted nitrobenzenes-an infrared, nuclear magnetic resonance, and density functional theory study, *J. Phys. Org. Chem.* 25 (2012) 58–68. doi:10.1002/poc.1868.

- [61] T.A.A. Enache, A.M.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry*. 81 (2011) 46–52. doi:10.1016/J.BIOELECTCHEM.2011.02.001.
- [62] C.G. Sanz, S.H.P. Serrano, C.M.A. Brett, Electrochemical characterization of cefadroxil β -lactam antibiotic and Cu(II) complex formation, *J. Electroanal. Chem.* 844 (2019) 124–131. doi:10.1016/J.JELECHEM.2019.04.077.
- [63] C.R. Woese, O. Kandler, M.L. Wheelis, Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.
- [64] H.F. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K.C. Martin, *Molecular cell biology*, n.d.
- [65] F. Capaldo-Kimball, S.D. Barbour, Involvement of recombination genes in growth and viability of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 106 (1971) 204–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4928007> (accessed November 19, 2019).
- [66] T.A. Langworthy, Lipids of Bacteria Living in Extreme Environments, *Curr. Top. Membr. Transp.* 17 (1982) 45–77. doi:10.1016/S0070-2161(08)60308-1.
- [67] J.W. Schopf, Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 6735–6742. doi:10.1073/pnas.91.15.6735.
- [68] S.J. Moore, M.J. Warren, The anaerobic biosynthesis of vitamin B12, in: *Biochem. Soc. Trans.*, 2012: pp. 581–586. doi:10.1042/BST20120066.
- [69] C. Freiberg, R. Fellay, A. Bairoch, W.J. Broughton, A. Rosenthal, X. Perret, Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes, *Nature*. 387 (1997) 394–401. doi:10.1038/387394a0.
- [70] B.A. Wilson, A.A. Salyers, D.D. Whitt, M.F. Winkler, *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*, 3rd Editio, American Society for Microbiology, Washington, DC, 2011.
- [71] B.S. Atiyeh, S.A. Dibo, S.N. Hayek, Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing, *Int. Wound J.* 6 (2009) 420–430. doi:10.1111/j.1742-481X.2009.00639.x.
- [72] J. Giesecke, *Modern Infectious Disease Epidemiology*, 3rd Editio, CRC Press, Stockholm, Sweden, 2017.
- [73] M.L. Kaplan, L. Kaplan, The Gram Stain and Differential Staining., *J. Bacteriol.* 25 (1933) 309–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16559618> (accessed November 21, 2019).
- [74] O. Lüderitz, M.A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehmann, E.T. Rietschel, D.H. Shaw, Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria, *Curr. Top. Membr. Transp.* 17 (1982) 79–151. doi:10.1016/S0070-2161(08)60309-3.
- [75] R.W. Jack, J.R. Tagg, B. Ray, Bacteriocins of gram-positive bacteria., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 59 (1995).
- [76] J. Li, J.J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C.S. Verma, R.W. Beurman, Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design, *Front. Neurosci.* 11 (2017). doi:10.3389/fnins.2017.00073.
- [77] D. Gottlieb, P.D. Shaw, *Antibiotics: Volume I Mechanism of Action*, Berlin Heidelberg, 1967.
- [78] K.J. Williams, The introduction of “chemotherapy” using arsphenamine - The first magic bullet, *J. R. Soc. Med.* 102 (2009) 343–348. doi:10.1258/jrsm.2009.09k036.
- [79] F. Bosch, L. Rosich, The contributions of paul ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize, *Pharmacology*. 82 (2008) 171–179. doi:10.1159/000149583.
- [80] J.A. Oates, A.J.J. Wood, G.R. Donowitz, G.L. Mandell, *Beta-Lactam Antibiotics*, N.

- Engl. J. Med. 318 (1988) 419–426. doi:10.1056/NEJM198802183180706.
- [81] D.J. Waxman, J.L. Strominger, Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics¹, Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 1983. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.004141.
- [82] R.R. Rando, On the mechanism of action of antibiotics which act as irreversible enzyme inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* 24 (1975) 1153–1160. doi:10.1016/0006-2952(75)90055-6.
- [83] X. Zeng, J. Lin, Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria, *Front. Microbiol.* 4 (2013). doi:10.3389/fmicb.2013.00128.
- [84] A. Nangia, K. Biradha, G.R. Desiraju, Correlation of biological activity in β -lactam antibiotics with Woodward and Cohen structural parameters - A Cambridge database study, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 5 (1996) 943–953. doi:10.1039/P29960000943.
- [85] J. Davies, Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes., *Science.* 264 (1994) 375–82. doi:10.1126/SCIENCE.8153624.
- [86] J. Davies, Origins and evolution of antibiotic resistance., *Microbiologia.* 12 (1996) 9–16. doi:10.1128/mmbr.00016-10.
- [87] J.R. Knowles, Penicillin resistance: the chemistry of beta-lactamase inhibition, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 97–104. doi:10.1021/ar00112a001.
- [88] K.F. Kong, L. Schneper, K. Mathee, Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology, *Apmis.* 118 (2010) 1–36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x.
- [89] E. Perez-Inestrosa, R. Suau, M.I. Montañez, R. Rodriguez, C. Mayorga, M.J. Torres, M. Blanca, Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5 (2005) 323–330. doi:10.1097/01.all.0000173788.73401.69.
- [90] R.N. Jones, A review of cephalosporin metabolism: A lesson to be learned for future chemotherapy, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (1989) 25–31. doi:10.1016/0732-8893(89)90042-4.
- [91] G. Bo, Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins, *Clin. Microbiol. Infect.* 6 (2000) 6–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2000.tb02032.x.
- [92] E.P. ABRAHAM, G.G. NEWTON, The structure of cephalosporin C., *Biochem. J.* 79 (1961) 377–393. doi:10.1042/bj0790377.
- [93] J.M.T. Hamilton-Miller, Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31 (2008) 189–192. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.11.010.
- [94] R.L. Perkins, E.J. Smith, S. Saslaw, Cephalothin and cephaloridine: comparative pharmacodynamics in chronic uremia., *Am. J. Med. Sci.* 257 (1969) 116–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4974464> (accessed November 21, 2019).
- [95] J.A.A. García-Rodríguez, J.L.L. Muñoz Bellido, J.E.E. García Sánchez, Oral cephalosporins: current perspectives, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 5 (1995) 231–243. doi:10.1016/0924-8579(95)00015-Z.
- [96] Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases - 7th Edition, (n.d.). <https://www.elsevier.com/books/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases/mandell/978-1-4557-0872-7> (accessed November 21, 2019).
- [97] R.E. Buck, K.E. Price, Cefadroxil, a new broad-spectrum cephalosporin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 11 (1977) 324–330.
- [98] B.A. de Marco, H.R.N. Salgado, Characteristics, Properties and Analytical Methods of Cefadroxil: A Review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 47 (2017) 93–98.

- doi:10.1080/10408347.2016.1219649.
- [99] F.R. Paula, S.H.P. Serrano, L.C. Tavares, Aspectos mecánicos da bioatividade e toxicidade de nitrocompuestos, *Quim. Nova.* 32 (2009) 1013–1020.
- [100] M. Di Rocco, M. Moloney, T. O’Beirne, S. Earley, B. Berendsen, A. Furey, M. Danaher, Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 β -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1500 (2017) 121–135. doi:10.1016/J.CHROMA.2017.04.022.
- [101] W.E.E. Van der Linden, J.W.W. Dieker, Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 119 (1980) 1–24. doi:10.1016/S0003-2670(00)00025-8.
- [102] S. Billová, R. Kizek, F. Jelen, P. Novotná, Square-wave voltammetric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk, and urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 362–369. doi:10.1007/s00216-003-2109-5.
- [103] C.G. Pérez, I.G. Martín, B.R. V De Aldana, Polarographic determination of clavulanic acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 383–386.
- [104] Q. Li, S. Chen, Studies on electrochemical behaviour of cephalexin, *Science (80-)*. 282 (1993) 145–152.
- [105] B. Feier, A. Gui, C. Cristea, R. Săndulescu, Electrochemical determination of cephalosporins using a bare boron-doped diamond electrode, *Anal. Chim. Acta.* 976 (2017) 25–34. doi:10.1016/j.aca.2017.04.050.
- [106] B. Dogan, A. Golcu, M. Dolaz, S. Ozkan, Electrochemical Behaviour of the Bactericidal Cefoperazone and its Selective Voltammetric Determination in Pharmaceutical Dosage Forms and Human Serum, *Curr. Pharm. Anal.* 5 (2009) 179–189. doi:10.2174/157341209788172924.
- [107] S.A. Özkan, N. Erk, B. Uslu, N. Yilmaz, I. Biryol, Study on electrooxidation of cefadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltammetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 263–273.
- [108] M. Rochelet, S. Solanas, L. Betelli, C. Neuwirth, F. Vienney, A. Hartmann, Amperometric detection of extended-spectrum β -lactamase activity: application to the characterization of resistant *E. coli* strains, *Analyst.* 140 (2015) 3551–3556. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AN01786B> (accessed February 27, 2018).
- [109] Rosy, R.N. Goyal, Estimation of Amoxicillin in Presence of High Concentration of Uric Acid and Other Urinary Metabolites Using an Unmodified Pyrolytic Graphite Sensor, *J. Electrochem. Soc.* 162 (2015) G8–G13. <http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/2.0691501jes>.
- [110] S. Gupta, R. Prakash, Photochemically assisted formation of silver nanoparticles by dithizone, and its application in amperometric sensing of cefotaxime, *J. Mater. Chem. C.* 2 (2014) 6859–6866. doi:10.1039/C4TC01090F.
- [111] S. Shahrokhian, S. Rastgar, Construction of an electrochemical sensor based on the electrodeposition of Au–Pt nanoparticles mixtures on multi-walled carbon nanotubes film for voltammetric determination of cefotaxime, *Analyst.* 137 (2012) 2706–2715. doi:10.1039/c2an35182j.
- [112] M.R. Majidi, K. Asadpour-Zeynali, B. Hafezi, Electrocatalytic oxidation and determination of ceftriaxone sodium antibiotic in pharmaceutical samples on a copper hexacyanoferrate nanostructure, *Anal. Methods.* 3 (2011) 646–652. doi:10.1039/c0ay00582g.
- [113] N. Kumar, Rosy, R.N. Goyal, Gold-palladium nanoparticles aided electrochemically reduced graphene oxide sensor for the simultaneous estimation of lomefloxacin and amoxicillin, *Sensors Actuators B Chem.* 243 (2017) 658–668.

- doi:10.1016/J.SNB.2016.12.025.
- [114] S.K. Yadav, B. Agrawal, R.N. Goyal, AuNPs-poly-DAN modified pyrolytic graphite sensor for the determination of Cefpodoxime Proxetil in biological fluids, *Talanta*. 108 (2013) 30–37. doi:10.1016/J.TALANTA.2013.02.044.
- [115] S. Majdi, A. Jabbari, H. Heli, H. Yadegari, A.A. Moosavi-Movahedi, S. Haghgoo, Electrochemical oxidation and determination of ceftriaxone on a glassy carbon and carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes, *J. Solid State Electrochem.* 13 (2009) 407–416. doi:10.1007/s10008-008-0567-6.
- [116] M. Aleksić, V. Savić, G. Popović, N. Burić, V. Kapetanović, Acidity constants of cefetamet, cefotaxime and ceftriaxone; the effect of the substituent at C3 position, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 752–756. doi:10.1016/j.jpba.2005.04.033.
- [117] P. Zuman, V. Kapetanović, M. Aleksić, Recent Developments in Electroanalytical Chemistry of Cephalosporins and Cefamycins, *Anal. Lett.* 33 (2000) 2821–2857. doi:10.1080/00032710008543225.
- [118] A.A. Abdel Gaber, M.A.A. Ghandour, H.S. El-Said, Polarographic studies of some metal(II) complexes with cephalosporins selected from the first generation, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1245–1260. doi:10.1081/AL-120020156.
- [119] N. Abo El-Maali, A.H. Osman, A.A.M. Aly, G.A.A. Al-Hazmi, Voltammetric analysis of Cu (II), Cd (II) and Zn (II) complexes and their cyclic voltammetry with several cephalosporin antibiotics, *Bioelectrochemistry.* 65 (2005) 95–104. doi:10.1016/j.bioelechem.2004.09.002.
- [120] P. Nigam, S. Mohan, S. Kundu, R.P.- Talanta, U. 2009, Trace analysis of cefotaxime at carbon paste electrode modified with novel Schiff base Zn (II) complex, *Talanta*. 77 (2009) 1426–1431. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008006887> (accessed March 7, 2019).
- [121] D. Tarinc, B. Dogan-Topal, M. Dolaz, A. Golcu, S. A. Ozkan, Synthesis, Characterization, Biological Activity and Voltammetric Behavior and Determination of Cefaclor Metal Complexes, *Curr. Anal. Chem.* 6 (2010) 316–328. doi:10.2174/1573411011006040316.
- [122] H. Muslu, A. Golcu, S. A. Ozkan, Electrochemical Study of Ceftazidime-Copper (II) Complex: Synthesis, Characterization, Biological Activity and Analytical Application to Pharmaceutical Dosage Forms, *Curr. Anal. Chem.* 6 (2010) 299–309. doi:10.2174/1573411011006040299.
- [123] M. Cesme, A. Golcu, M. Dolaz, M. Tumer, H. Zengin, S. A. Ozkan, Synthesis and Voltammetric Behavior of Loracarbef Metal Complexes, *Lett. Org. Chem.* 9 (2012) 35–44. doi:10.2174/157017812799304042.
- [124] A.A.A. Taherpour, D. Narian, A.A.A. Taherpour, Structural relationships and theoretical study of the free energies of electron transfer, electrochemical properties, and electron transfer kinetic of cephalosporin antibiotics derivatives with fullerenes in nanostructure of [R]·C_n (R = cefadroxil, cefep, J. Nanostructure Chem. 5 (2015) 153–167. doi:10.1007/s40097-014-0146-6.
- [125] A.D. Russel, I. Ahonkhai, D.T. Rogers, Microbiological Applications of the Inactivation of Antibiotics and Other Antimicrobial Agents, *J. Appl. Bacteriol.* 46 (1979) 207–245. doi:10.1111/j.1365-2672.1979.tb00818.x.
- [126] M.C. Damle, S.R. Salunke, Development and validation of stability-indicating HPLC method for determination of boceprevir, *Int. Res. J. Pharm.* 7 (2016) 47–53. doi:10.7897/2230-8407.07895.
- [127] A. Mohammad A, Comparison of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Cefaclor Monohydrate in Pharmaceutical Dosages, *Med. Chem.*

- (Los. Angeles). 6 (2016). doi:10.4172/2161-0444.1000317.
- [128] M. Arafat, S. Golocorbin-kon, M. Mikov, The measurement of cefotaxime sodium in rat plasma after oral administration: a sensitive HPLC-UV method, *Int J Pharm Pharm Sci.* 7 (2015) 343–346. (accessed March 8, 2019).
- [129] The International Pharmacopoeia, (2019). <https://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (accessed February 5, 2020).
- [130] R.N. Adams, *Electrochemistry at solid electrodes*, Marcel-Dekker, New York, 1969.
- [131] K.A. Connors, G.L. Amidon, V.J. Stella, *Chemical stability of pharmaceuticals : a handbook for pharmacists*, Wiley, New York, 1986.
- [132] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways, *J. Electroanal. Chem.* (2011). doi:10.1016/j.jelechem.2011.02.022.
- [133] V. Diculescu, A.-M. Paquim, A.M. Brett, Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage, *Sensors.* 5 (2005) 377–393. doi:10.3390/s5060377.
- [134] T.A. Enache, A.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Bioelectrochemistry.* 81 (2011) 46–52. doi:10.1016/J.BIOELECHEMA.2011.02.001.
- [135] K. Uosaki, Y. Sato, H. Kita, Electrochemical Characteristics of a Gold Electrode Modified with a Self-Assembled Monolayer of Ferrocenylalkanethiols, *Langmuir.* 7 (1991) 1510–1514. doi:10.1021/la00055a038.
- [136] L. Gorton, Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanalysis.* 7 (1995) 23–45. doi:10.1002/elan.1140070104.
- [137] G.G. Wildgoose, C.E. Banks, H.C. Leventis, R.G. Compton, Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis, *Microchim. Acta.* 152 (2006) 187–214. doi:10.1007/s00604-005-0449-x.
- [138] V. Mirceski, A. Aleksovska, B. Pejova, V. Ivanovski, B. Mitrova, N. Mitreska, R. Gulaboski, Thiol anchoring and catalysis of gold nanoparticles at the liquid interface of thin-organic film-modified electrodes, *Electrochem. Commun.* 39 (2014) 5–8. doi:10.1016/j.elecom.2013.11.020.
- [139] R.W. Murray, Chemically Modified Electrodes, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 135–141. doi:10.1021/ar50149a002.
- [140] R.C. Engstrom, V.A. Strasser, Characterization of Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrodes, *Anal. Chem.* 56 (1984) 136–141. doi:10.1021/ac00266a005.
- [141] J. Zavazalova, M.E. Ghica, K. Schwarzova-Peckova, J. Barek, C.M.A.A. Brett, Carbon-Based Electrodes for Sensitive Electroanalytical Determination of Aminonaphthalenes, *Electroanalysis.* 27 (2015) 1556–1564. doi:10.1002/elan.201400719.
- [142] W.E. Van der Linden, J.W. Dieker, Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 119 (1980) 1–24. doi:10.1016/S0003-2670(00)00025-8.
- [143] H. Zare, S. Golabi, Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 464 (1999) 14–23. doi:10.1016/S0022-0728(98)00459-8.
- [144] J. Chen, W. Li, D. Wang, S. Yang, J. Wen, Z. Ren, Electrochemical characterization of carbon nanotubes as electrode in electrochemical double-layer capacitors, *Carbon N. Y.* 40 (2002) 1193–1197. doi:10.1016/S0008-6223(01)00266-4.
- [145] L.C. Almeida, R.D. Correia, A. Marta, G. Squillaci, A. Morana, F. La Cara, J.P. Correia, A.S. Viana, Electrosynthesis of polydopamine films - tailored matrices for

- laccase-based biosensors, *Appl. Surf. Sci.* 480 (2019) 979–989. doi:10.1016/j.apsusc.2019.03.015.
- [146] G. Hu, Y. Guo, S. Shaoa, Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using the nano-gold self-assembled glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. 21 (2009) 1200–1206. doi:10.1002/elan.200804510.
- [147] S.H. Ku, M. Lee, C.B. Park, Carbon-Based Nanomaterials for Tissue Engineering, *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 244–260. doi:10.1002/adhm.201200307.
- [148] Q. Zhao, Z. Gan, Q. Zhuang, Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes, *Electroanalysis*. 14 (2002) 1609–1613. doi:10.1002/elan.200290000.
- [149] G.A. Rivas, M.D. Rubianes, M.C. Rodríguez, N.F. Ferreyra, G.L. Luque, M.L. Pedano, S.A. Miscoria, C. Parrado, Carbon nanotubes for electrochemical biosensing, *Talanta*. 74 (2007) 291–307. doi:10.1016/J.TALANTA.2007.10.013.
- [150] J. Wang, Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Electroanalysis*. 17 (2005) 7–14. doi:10.1002/elan.200403113.
- [151] P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, J. Riu, F.X. Rius, Electrochemical sensing based on carbon nanotubes, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 939–953. doi:10.1016/j.trac.2010.06.006.
- [152] A.A. Ensafi, E. Heydari-Bafrooei, B. Rezaei, Simultaneous detection of hydroxylamine and phenol using p-aminophenol-modified carbon nanotube paste electrode, *Chinese J. Catal.* 34 (2013) 1768–1775. doi:10.1016/S1872-2067(12)60652-4.
- [153] A.J.G.G. Zarbin, M.M. Oliveira, Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo vadis?, *Quim. Nova*. 36 (2013) 1533–1539. doi:10.1590/S0100-40422013001000009.
- [154] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, The influence of carbon nanotubes and polyazine redox mediators on the performance of amperometric enzyme biosensors, *Microchim. Acta*. 170 (2010) 257–265. doi:10.1007/s00604-010-0325-1.
- [155] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, Poly(brilliant green) and poly(thionine) modified carbon nanotube coated carbon film electrodes for glucose and uric acid biosensors, *Talanta*. 130 (2014) 198–206. doi:10.1016/j.talanta.2014.06.068.
- [156] J. Zavazalova, M.E. Ghica, K. Schwarzova-Peckova, J. Barek, C.M.A. Brett, Carbon-Based Electrodes for Sensitive Electroanalytical Determination of Aminonaphthalenes, *Electroanalysis*. 27 (2015) 1556–1564. doi:10.1002/elan.201400719.
- [157] M.M. Barsan, C.M.A. Brett, Graphene and carbon nanotube nanomaterials in layer-by-layer structured electrochemical enzymatic biosensors: A review, *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* 60 (2015) 31–52.
- [158] Y. Vlamidis, I. Gualandi, D. Tonelli, Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 285–292. doi:10.1016/J.JELECHEM.2017.06.012.
- [159] S.N. Kim, J.F. Rusling, F. Papadimitrakopoulos, Carbon Nanotubes for Electronic and Electrochemical Detection of Biomolecules, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3214–3228. doi:10.1002/adma.200700665.
- [160] H.S. Magar, E. Ghica, N. Abbas, Highly Sensitive Choline Oxidase Enzyme Inhibition Biosensor for Lead Ions Based on Multiwalled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes, (2017) 1741–1748. doi:10.1002/elan.201700111.
- [161] M.E. Ghica, R. Pauliukaite, O. Fatibello-Filho, C.M.A. Brett, Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors, *Sensors Actuators B Chem.* 142 (2009) 308–315. doi:10.1016/J.SNB.2009.08.012.

- [162] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 5848–5866. doi:10.1016/j.electacta.2008.03.005.
- [163] C.M. Welch, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 601–619. doi:10.1007/s00216-005-0230-3.
- [164] H.S. Magar, M.E. Ghica, M.N. Abbas, C.M.A. Brett, A novel sensitive amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles, *Talanta.* 167 (2017) 462–469. doi:10.1016/j.talanta.2017.02.048.
- [165] B. Kim, W.M. Sigmund, Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites, *Langmuir.* 20 (2004) 8239–8242. doi:10.1021/la049424n.
- [166] A. Wong, C.A. Razzino, T.A. Silva, O. Fatibello-Filho, Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film, *Sensors Actuators, B Chem.* 231 (2016) 183–193. doi:10.1016/j.snb.2016.03.014.
- [167] M.L. Yola, N. Atar, A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin, *Electrochim. Acta.* 119 (2014) 24–31. doi:10.1016/j.electacta.2013.12.028.
- [168] E.R. Sartori, F.C. Vicentini, O. Fatibello-Filho, Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film, *Talanta.* 87 (2011) 235–242. doi:10.1016/j.talanta.2011.10.003.
- [169] N. Ben Messaoud, M.E. Ghica, C. Dridi, M. Ben Ali, C.M.A. Brett, Electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticle modified electrode for the sensitive detection of bisphenol A, *Sensors Actuators, B Chem.* 253 (2017) 513–522. doi:10.1016/j.snb.2017.06.160.
- [170] S.-F. Wang, L. Shen, W.-D. Zhang, Y.-J. Tong, Preparation and Mechanical Properties of Chitosan/Carbon Nanotubes Composites, (2005). doi:10.1021/bm050378v.
- [171] M. Ghalkhani, S. Shahrokhian, F. Ghorbani-Bidkorbeh, Voltammetric studies of sumatriptan on the surface of pyrolytic graphite electrode modified with multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles, *Talanta.* 80 (2009) 31–38. doi:10.1016/j.talanta.2009.06.019.

APÊNDICE 1

TRATAMENTO ESTATÍSTICO EM EXPERIMENTOS ELETROANALÍTICOS

A química analítica moderna, em sua grande maioria, baseia-se em análises instrumentais, nas quais a quantificação de um analito alvo é correlacionada com um sinal referência. No caso da eletroanálise, em especial a voltametria e amperometria, a quantificação de um analito é feita com base na resposta eletroquímica (corrente, carga, etc) do analito quando este é submetido a um processo redox (oxidação ou redução) que ocorre sob potencial aplicado na superfície de um sensor. A resposta eletroquímica deve ser função da concentração do analito em solução permitindo, assim, a quantificação da espécie de interesse. O tratamento de dados é realizado, neste caso, a fim de avaliar se a técnica empregada apresenta precisão, exatidão, confiabilidade em uma determinada faixa de concentrações e baixos valores de erro.

Curvas de calibração são obtidas através da avaliação da resposta instrumental diretamente dependente da adição de concentrações crescentes do analito advindo de uma solução padrão. A regressão linear dos pontos obtidos estabelece a equação da reta ($y = mx + b$) que melhor descreve o comportamento entre a resposta instrumental (y) e a concentração do analito (x), em que m corresponde ao coeficiente angular e b é a resposta instrumental quando a concentração do analito é zero. Usualmente o valor de b deve ser zero, já que quando não há analito, não deve haver resposta. Empiricamente, tendo em vista que o preparo de amostra não é ideal (erros sistemáticos) e há presença de variações instrumentais (devido ao sensor, eletrólito, ruído), isto nem sempre ocorre. O coeficiente de correlação (R^2) é uma medida do grau de correlação entre a concentração do analito e a

resposta instrumental (não uma medida de linearidade), no qual um valor próximo a 1 indica um baixo valor de incerteza. O cálculo do erro padrão associado a regressão linear, $S(r)$, este atrelado a medida do desvio do sinal instrumental, de acordo com a equação (A.1),

$$S(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (A1)$$

em que y_i é o valor de y observado para uma determinada concentração do analito x_i , \hat{y}_i é o valor de y observado na regressão linear em uma determinada concentração do analito e n é o número de amostras analisadas.

Sendo assim, parâmetros como sensibilidade do método (coeficiente angular da da reta), limite de detecção (menor quantidade de analito determinada com distinção do sinal do branco), limite de quantificação (menor quantidade do analito determinada com confiabilidade suficiente) e a faixa de linearidade (faixa de concentração em que a determinação apresenta baixo desvio para a regressão linear) podem ser facilmente obtidos através da curva de calibração, Figura A1.

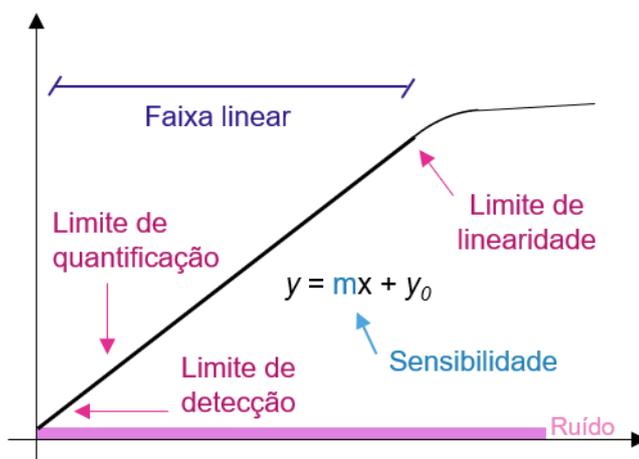


Figura A1. Curva de calibração e parâmetros de interesse.

A partir da curva de calibração, o limite de detecção é calculado usando a concentração analítica que gera uma resposta com fator de confiança k superior ao valor do desvio padrão do branco. O limite de quantificação é calculado a partir de um fator de confiança que distingue os valores mais baixos de concentração que operam com precisão suficiente. Ambos são calculados de acordo com a equação (A.2) e (A.3), respectivamente,

$$LoD = 3 \cdot \frac{S_b}{m} \quad (A.2)$$

$$LoQ = 10 \times \frac{S_b}{m} \quad (A.3)$$

em que S_b é o desvio padrão da medida de sinal de 10 brancos e m o coeficiente angular da reta.

Esta abordagem é utilizada quando o analito a ser determinado apresenta concentração conhecida (solução padrão) e há a necessidade de avaliar o desempenho do método empregado (técnica, material do eletrodo etc.). Porém, no estudo de fármacos, usualmente medidas relacionadas ao controle de qualidade e à quantificação de substâncias em amostras complexas se faz necessária. Nestas situações, a concentração do analito usualmente é desconhecida, e, em termos analíticos, é possível realizar experimentos os quais permitem a quantificação dos mesmos em suas matrizes originais.

Um dos métodos importantes de análise de quantificação de fármacos, tanto em amostras de cápsulas comerciais quanto em matrizes biológicas (urina, sangue, plasma), é o método da adição de padrão. Este método proporciona uma minimização dos efeitos de matriz e o sinal detectado pode ser relacionado com a concentração do analito desde que a concentração do analito esteja dentro da faixa linear de resposta dos sensor. A fim de quantificar uma substância, são realizadas adições de uma solução estoque padrão com concentração conhecida, e o sinal analítico obtido é então representado graficamente em função dos

valores de concentração da solução estoque de padrão adicionados, considerando o fator de diluição, Figura A2. A regressão linear destes dados permite a atribuição da concentração da amostra desconhecida através da extrapolação da curva para o eixo x .

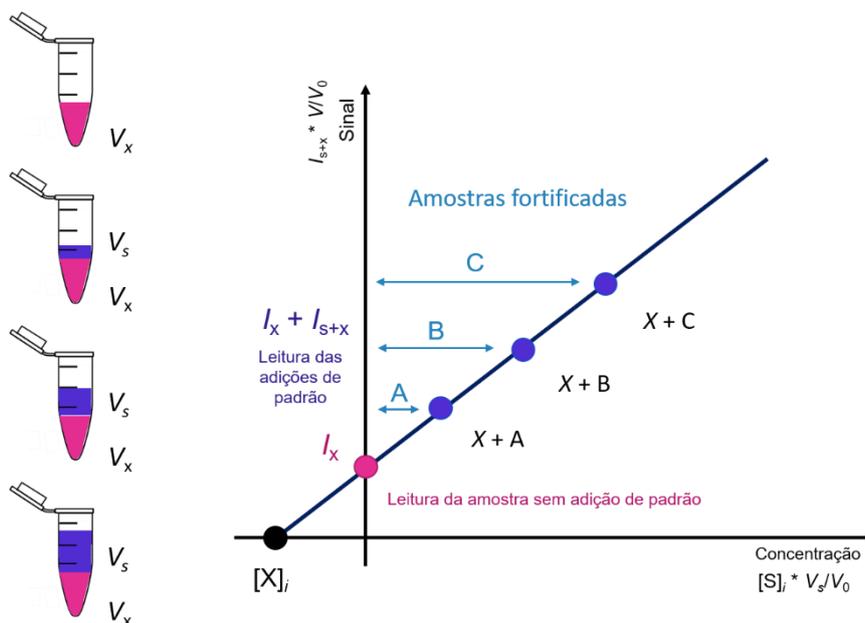


Figura A2. Esquema do método de adição de padrão e gráfico indicando a extrapolação da regressão linear para obter o valor da concentração do analito na amostra desconhecida.

Para tal, a relação entre o sinal e a concentração das espécies é expressa por meio da equação (A.4),

$$\frac{[X]_i}{[S]_f + [X]_f} = \frac{I_x}{I_{x+s}} \quad (A.4)$$

em que $[X]_i$ é a concentração inicial da amostra, $[S]_f$ é a concentração do padrão após a adição, $[X]_f$ é a concentração final da amostra após a adição, I_x é o sinal analítico referente a amostra desconhecida e I_{x+s} é o sinal analítico referente a amostra desconhecida contendo o padrão adicionado.

O cálculo da recuperação (%) relaciona o quanto o método empregado retorna o sinal relacionado ao analito padrão em uma matriz desconhecida, considerando erros sistemáticos

advindos do procedimento analítico (impurezas na amostra, preparação da amostra, efeitos de interferentes, etc). Tipicamente, a quantidade de analito padrão adicionado à amostra deve se encontrar dentro da faixa linear observada através da curva de calibração e nem sempre a concentração do analito nesta amostra complexa é conhecida. Para tal, a porcentagem de recuperação pode ser calculada de acordo com a equação (A.5),

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{S_{\text{Amostra fortificada}} - S_{\text{Amostra original}}}{S_{\text{Amostra padrão}}} \times 100 \quad (\text{A.5})$$

em que $S_{\text{Amostra fortificada}}$ corresponde ao sinal obtido após a injeção da solução padrão, $S_{\text{amostra original}}$ corresponde ao sinal obtido referente à medida realizada na presença da amostra desconhecida, e $S_{\text{Amostra padrão}}$ corresponde ao sinal relativo à concentração da solução padrão injetada, referente à curva de calibração.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Caroline Sanz Gomes

Data de nascimento: 10/08/1989, Santos/SP – Brasil

EDUCAÇÃO

2007/2013

Bacharelado em Química com Atribuição em Tecnologia pelo Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, Brasil.

Orientador de monografia: Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo

2014/2015

Mestre em Ciências: Química pelo Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química (IQ-USP), Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sílvia Helena Pires Serrano

2016/2020

Estudante de doutorado em Ciências: Química pelo Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química (IQ-USP), Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil, com período sanduíche na Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sílvia Helena Pires Serrano

Orientador no exterior: Prof. Dr. Christopher M. A. Brett

OCUPAÇÃO

Bolsista de iniciação científica pelo CNPQ (Projeto 576952/2008-7), 2008.

Bolsista de mestrado pelo CNPQ (Edital MCT/CNPq, Projeto 154493/2014-7), 2014.

Bolsista de doutorado pela CAPES (PQI, Projeto 33002010191P0), 2016.

ANEXO I

CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS (2016-2020)

Artigos Publicados

[1] Caroline G. Sanz, Silvia H. P. Serrano, Christopher M. A. Brett, Electrochemical characterization of cefadroxila β -lactam antibiotic and Cu(II) complex formation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 844, 124-131.

Abstract: The electrochemical behaviour of cefadroxila, a first-generation β -lactam antibiotic, was studied at glassy carbon electrodes in aqueous media over a wide range of pH. The first oxidation process is of the phenol moiety and follows an ECE mechanism, generating catechol and resorcinol derivatives as sub-products, which are then reduced and oxidized in subsequent cycles. The sulphur heteroatom present in the cyclic structure close to the β -lactam moiety is oxidized in two steps generating sulphoxide and sulphone. This process was identified from direct comparison with amoxicillin, which has a similar molecular structure, although they belong to different classes of β -lactam antibiotics. For amoxicillin, oxidation of the sulphur heteroatom occurred at more positive potentials, most likely due to structural difficulties in stabilizing the charged oxidized species. Formation of a complex between copper (II) and each of the antibiotics was studied by cyclic voltammetry. Finally, determination of cefadroxila in commercial samples was successfully carried out.

Artigos submetidos

[2] Caroline G. Sanz, Silvia H. P. Serrano, Christopher, M. A. Brett, Electroanalysis of cefadroxila antibiotic at carbon nanotube / gold nanoparticle modified glassy carbon electrodes, *ChemElectroChem*, submetido em 14 de fevereiro de 2020.

Abstract: The electrochemical characterization and determination of the antibiotic cefadroxila were carried out at multi-walled carbon nanotube and gold nanoparticle modified glassy carbon electrodes (GCE). Oxidation of the phenol moiety of cefadroxila occurred at slightly less positive potentials and with a higher current response than at bare GCE. Differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectra showed that the

architecture combining carbon nanotube plus gold nanoparticle surface modification is the best in pH 7 buffer solution. Scanning electron microscopy demonstrated good coverage of the gold nanoparticles on the carbon nanotubes. The fixed potential amperometric determination of cefadroxila was carried out at +0.74 V vs Ag/AgCl with a limit of detection of 0.22 μ M. Analysis of cefadroxila in commercial samples presented high recovery values and the amount of the pharmaceutical in each capsule was in excellent agreement with that measured by UV-vis spectroscopy.

Artigos em fase final de redação

[3] Caroline G. Sanz, Kevin A. Dias, Raphael P. Bacil, Ricardo A.M. Serafim, Leandro H. Andrade, Elizabeth I. Ferreira, Silvia H. P. Serrano, Mesomeric correlation towards stability of nitro anion radical obtained from electrochemical measurements for *-para* and *-meta* nitro compounds antichagasic candidates

Artigos em colaboração

[4] Raphael P. Bacil, Rafael M. Buoro, Othon S. Campos, Matesa A. Ramos, Caroline G. Sanz, Silvia H. P. Serrano, Electrochemical behaviour of dipyrone (metamizole) and others pyrazolones, *Electrochimica Acta*, 2018, 273, 358-366.

Abstract: The electrochemical oxidation of dipyrone (MTM) in aqueous medium was characterized using antipyrine (AA), 4-aminoantipyrine (4AA), 4-methyl-aminoantipyrine (MAA) and 4-dimethyl-aminoantipyrine (DMAA) as model molecules for the elucidation of all MTM voltammetric signals. The MTM and the other pyrazolones show up to four oxidation electrochemical processes. The voltammograms obtained in AA solutions presented an irreversible electrochemical oxidation process involving one electron at E_{ap3} , which is common to all pyrazolone derivatives, while the amino pyrazolones present electrochemical oxidation processes at E_{ap0} or E_{ap1} . The stabilization of the oxidation products depends on different effects: the proton release added to the thermodynamic stability, in the case of the imine formation at E_{ap0} (4AA and MAA) and the hyperconjugation (σ -stabilization) in the case of iminium formation (DMAA and MTM) at E_{ap1} . The process observed at E_{pa0} corresponds to the pH-dependent oxidation of the primary

and secondary enamines, while the process observed at E_{ap1} occurs in the tertiary enamines, is pH independent. The oxidation peak potential follows the order: MAA < 4AA < DMAA < MTM and it was demonstrated that DMAA in an aqueous medium can simulate the MTM in an aprotic medium; therefore, the analytical MTM determination can be performed using the DMAA aqueous analytical curve. DMAA and MTM analytical curves, presented a linear range from 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with a LOD of 1.94 and 2.97 μM for DMAA and MTM, respectively, LOQ of 6.48 and 9.91 μM ($n=10$) and, sensitivity of 0.96 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ for DMAA and 0.92 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$; with a recoveries of 95 – 105 % for MTM.

[5] Rafael M. Buoro, Raphael P. Bacil, Caroline G. Sanz, Othon S. Campos, Silvia H. P. Serrano, Biomimetic behavior and nanomolar detection of hydrogen peroxide on an electrochemically pre-treated hematin modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 250, 169-178.

Abstract: An electrochemical pre-treatment of a glassy carbon electrode in sodium bicarbonate solution was performed to adsorb hematin (aHtin-GCE), an iron (III) porphyrin present in heme-containing proteins, in order to prepare a new biomimetic sensor for peroxidases. The aHtin-GCe presented peroxidase catalytic activity and a biomimetic behavior related to enzymes responsible for the reduction of H_2O_2 . The previous glassy carbon surface functionalization in bicarbonate solution also proved to be an essential parameter to be controlled as it provides carboxylic acids terminations, which stabilizes the hematin molecule on the electrode surface. The aHtin-GCE kinetics fitted with the Michaelis–Menten model assume the formation of an enzyme-substrate complex in which H_2O_2 bonds to the electrochemically reduced iron(II) center with further reduction of the peroxide to peroxy radical. The observation that lithium ions act as competitive inhibitors toward H_2O_2 also provided the insight toward the application of the aHtin-GCE as a model dispositive to evaluate peroxidase inhibitors. The aHtin-GCE peak current presented a linear correlation with the concentration of H_2O_2 from the 400 nM to 800 nM range with an experimental LoD of 0.11 μM .

ANEXO II

CONTRIBUIÇÕES ACADÊMICAS (2016-2020)

Aulas de graduação e pós-graduação

2016

QFL 0230 - *Química analítica I - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP*

Monitoria em aula teórica e aula experimental

2018

QFL5713 - *Química eletroanalítica: fundamentos e aplicações*

Tema de aula: Voltametria cíclica (e de pulso diferencial) e seu uso na elucidação de processo de eletrodos. Bioeletroquímica.

Aula experimental: Construção de um eletrodo biomimético de hematina e utilização para determinação de peróxido de hidrogênio

2019

QFL5713 - *Química eletroanalítica: fundamentos e aplicações*

Tema de aula: Voltametria cíclica (e de pulso diferencial) e seu uso na elucidação de processo de eletrodos. Bioeletroquímica.

Aula experimental: Caracterização eletroquímica de candidatos antichagásicos: estabilização do nitro ânion radical em meio aquoso e interação com oxigênio

Coorientações de alunos de iniciação científica

Pedro Henrique Martins Garcia

Título do trabalho: *“Desenvolvimento de eletrodos compósitos contendo nanopartículas metálicas de paládio para a detecção simultânea de catecolaminas”*

Matheus Silvio Bernardo Marassatti

Título do trabalho: *“Desenvolvimento de biosensores de peroxidase compósitos contendo nanopartículas de carbono vítreo e sílica FDU-12”*

Sara do Nascimento Ferreira

Título do trabalho: *“Desenvolvimento de biosensores voltamétricos de glicose utilizando compósitos carbono-sílica mesoporosa FDU-12”*

ANEXO III

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS (2016-2020)

- [1] *XXIV Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica*, “Caracterização eletroquímica em meio aquoso de intermediários reativos da redução de nitrocompostos candidatos a fármacos antichagásicos”, Montevideu, Uruguai, 2020.
- [2] *70th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, “Electro-oxidation pathway and determination of cefadroxila at carbon nanotube / gold nanoparticle modified glassy carbon electrodes”, Durban, África do Sul, 2019.
- [3] *69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry* “The Oxidation Processes of First Generation β -Lactam Antibiotics at Nanomaterial and Polymer-Modified Glassy Carbon Electrodes”, Bologna, Itália, 2018.
- [4] *23rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry* “Electrochemical Characterization of β -lactam Antibiotics at Glassy Carbon and Carbon Nanomaterial Modified Electrodes”, Vilnius, Lituânia, 2018.
- [5] *9th Meeting of Division of Analytical Chemistry* “Electrochemical characterization of cefadroxila and amoxicillin in aqueous media”, Porto, Portugal, 2018.
- [6] *46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly* “ Development of self-assembled monolayer of thiol on gold electrodes and application for the in situ formation of gold nanoparticles”, São Paulo, Brasil, 2017.