



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

Marílya Palmeira Galdino da Silva

Estudos bioeletroquímicos de nitroderivado 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila em interação com β -ciclodextrina e PAMAM 3^a geração

Maceió – AL

2017

Marílya Palmeira Galdino da Silva

Estudos eletroquímicos de interação de nitroderivado 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila com β -ciclodextrina e PAMAM 3^a geração

Dissertação de Mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alagoas.

Orientação: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Maceió – AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586e Silva, Marílya Palmeira Galdino da
Estudos eletroquímicos de interação do nitroderivado 2-[(4-nitrofenil) – amino]
- 4,5,6,7 – tetraidro-4h-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila com β -ciclodextrina e
PAMAM 3^a geração / Marílya Palmeira Galdino da Silva. – 2017.
85 f. : il.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 74-82.
Anexos: f. 83-85

1. Nitrocompostos. 2. Ciclodextrina. 3. Dendrímeros. 4. Eletroquímica.
I. Título.

CDU: 544.6



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Marilya Palmeira Galdino da Silva**, intitulada: “Estudos eletroquímicos de interação do nitroderivado **2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila com β -ciclodextrina e PAMAM 3ª geração**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 20 de fevereiro de 2017, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA:

Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Prof. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Camila Calado de Vasconcelos
Prof. Dra. Camila Calado de Vasconcelos
(CESMAC)

Diógenes Meneses dos Santos
Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)

- ❖ Ao meu pai Amaro Galdino, a minha mãe Marta Verônica, meus alicerces, a quem devo tudo que sou hoje;
- ❖ A minha irmã Martinha, que sempre me apoiou;
- ❖ Aos meus avôs paternos Maria Francisca e José Galdino (*in memoriam*) e maternos Creuza e Joaquim Palmeira (*in memoriam*);
- ❖ Ao meu namorado Felipe, por ser meu parceiro em todos os momentos e sempre acreditar em mim.

Agradeço,

Sempre e em tudo a Deus, Ele quem me guiou até esse momento e em tudo se mostrou presente em minha vida, sei que tudo que conquistei até aqui foi por permissão Dele, a Ele entrego todos meus anseios, tristezas, dúvidas, alegrias, vitórias, todos os meus sonhos.

Aos meus pais, cujo amor que sentindo não consigo descrever, a quem dedico toda minha vida. É por vocês que não meço esforços para alcançar meus (nossos) objetivos, por vocês que me mantive firme diante de todas as adversidades, por vocês trilho cada passo da minha vida, com o propósito de algum dia ser capaz de retribuir todo amor que me dedicaram, tudo que faço, fiz é para que possam ter orgulho de mim assim como me orgulho de vocês, obrigada por tudo.

A minha irmã Martinha, minha companheira de vida, que acompanhou meu dia a dia de pertinho, me apoiando, me animou quando foi preciso, compreendeu meus momentos de estresses e que foi meu referencial de lar nesses anos longe de casa, obrigada por todo amor e paciência.

Ao meu namorado/parceiro Felipe, por acreditar em mim, mesmo quando desamino. Por ser meu apoio constante e incondicional, por conseguir, mesmo a distância se fazer sempre presente, me passando toda segurança que preciso. Por me ouvir (até mesmo meus ensaios de apresentação sem entender nada kkkkk), por ser meu amigo e incentivador, obrigada por me permitir compartilhar tudo com você.

A toda minha família, por sempre confiar em mim e no meu potencial, de modo muito especial as minhas avós Creuza e Mariinha, meus exemplos de vida, minhas guerreiras, são vocês que me inspiram com vossas força e dedicação a família.

Aos meus amigos que me ajudaram a tornar tudo mais alegre e divertido.

As minhas farmacêuticas, Bia, Amanda e Val, que mesmo sem a convivência diária, estiveram sempre comigo. Vocês são presentes de Deus na minha vida. A minha quarta farmacêutica e sempre companheira Carol, Deus nos manteve juntas e assim será sempre, seja no laboratório, na sala de aula ou na vida, obrigada por todo conhecimento compartilhado, por todos momentos vividos, por me amparar e mostrar que sempre estava ali pronta para me ajudar, você é fundamental em minha vida.

Aos meus inicialmente companheiros de laboratório e agora amigos, Samaysa, Renata e Ygor, por dividir a rotina no laboratório, os estresses e alegrias do dia a dia, estarem sempre à disposição para ajudar, vocês foram fundamentais nesse processo,

o resultado disso foi uma amizade linda que atravessou as paredes do laboratório, obrigada por cada momento vivido.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Fabiane Caxico, pelos inúmeros ensinamentos, por confiar em mim e em meu potencial ao longo desses seis anos de trabalho, serei eternamente grata pela confiança e apoio que sempre recebi.

A todos que fazem parte do Laboratório de Eletroquímica e Microsistemas de Análises, por todos as discussões e aprofundamento acadêmico, mas também por todas as risadas e momentos de descontração, sou muito feliz por integrar a família LEMAM.

A todos os professores que compõe o corpo docente do Instituto de Química e Biotecnologia, de modo especial professora Sônia Salgueiro minha supervisora, junto com minha orientadora no estágio à docência e a todos que tive a oportunidade de compartilhar do saber em sala de aula

Ao professor Dr^o Thiago Aquino, por gentilmente ter sintetizado e cedido a substância para os estudos que culminaram nessa dissertação.

Aos Técnicos da Central Analítica da UFPE, Eliete e Pablo, pela disposição e realização das análises de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho. E às agências financiadoras FAPEAL e CNPq/PROSUL pelo apoio financeiro ao grupo.

“O coração do homem planeja seus passos, mas é o Senhor quem dirige seus caminhos” Pr 16, 9.

RESUMO

Os nitrocompostos aromáticos são muito aplicados na indústria farmacêutica por suas conhecidas propriedades biológicas. Um dos prováveis mecanismos de ação dessa classe de compostos pode estar envolvido em reações de oxirredução. A identificação do nitro e de seus produtos, por uma técnica simples, sensível e de baixo custo como as técnicas eletroquímicas, é fundamental, pois através delas é possível analisar o processo de solubilização desses compostos em associação com alguns agentes encapsulantes. Uma característica do nitrocomposto estudado, 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila, (6CN10) é sua baixa solubilidade em água, o que justifica sua associação com substâncias como ciclodextrina e dendrímeros, como o PAMAM. A formação de um complexo de inclusão entre o 6CN10 e a β -Ciclodextrina e 6CN10 e PAMAM 3ª geração foi avaliado nesse trabalho através das técnicas eletroquímicas e espectroscópicas. O sistema eletroquímico utilizado foi composto por 3 eletrodos, Ag/AgCl/Cl⁻ saturado (referência), platina (auxiliar), carbono vítreo com e sem modificação com nanotubos de carbono (NTC) ou ouro (Au) (trabalho), em meio tamponado pH 7,03 com e sem um co-solvente, e em uma solução de Na₂SO₄ a 0,2 mol L⁻¹. Também foram realizados estudos espectroscópicos por UV-Vis em meio aquoso-etanólico em diferentes concentrações de β -Ciclodextrina, bem como a caracterização do complexo 6CN10:PAMAM em solução metanólica. Os estudos demonstraram que o 6CN10 possui mecanismo de redução padrão de nitroaromáticos com potencial dentro da faixa esperada para compostos com atividade biológica, podendo seu mecanismo de ação estar associado ao processo redox. As primeiras análises demonstram a interação do 6CN10 como β -CD e a influência do tempo nesse processo. Através da formação de uma monocamada auto-organizada (SAM) de β -CD-SH no eletrodo de Au, foi possível determinar a constante de equilíbrio entre o complexo 6CN10: β -CD com valor de $3,3 \times 10^5$ M⁻¹. Já por métodos espectrofotométricos, a constante foi de $7,86 \times 10^4$ M⁻¹. Em relação ao PAMAM os primeiros resultados verificaram a influência do tempo na formação do complexo entre 6CN10:PAMAM, chegando ao tempo otimizado de 30 min. Em seguida, com as variações crescentes na concentração de 6CN10 foi possível determinar a constante de equilíbrio ($K_f = 5,61 \times 10^5$ M⁻¹) entre o complexo 6CN10:PAMAM em sensor de NTC. Observou-se que o valor obtido é relativamente maior em comparação com a constante eletroquímica para o complexo 6CN10: β -CD. Tal comportamento de favorecimento do complexo 6CN10:PAMAM também pode ser observado pelo valores de LD e LQ obtidos, que foram, respectivamente, $1,49 \times 10^{-6}$ e $4,96 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o complexo com PAMAM e de $1,83 \times 10^{-6}$ e $6,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para β -CD. Quando a SAM de PAMAM-MUA foi utilizada, a constante obtida foi de $2,16 \times 10^5$ M⁻¹. Ao caracterizar o complexo 6CN10:PAMAM por UV-Vis, os resultados demonstraram que uma quantidade maior que o n° de ramificações do PAMAM (32 ramificações) e do 6CN10 interagiram, propondo que o nitro interage por diferentes formas com o PAMAM. Ambos os agentes encapsulantes demonstraram eficiência para formação do complexo com o composto em estudo, porém o PAMAM apresentou uma sutil vantagem. Entretanto, ambos poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de diferentes formulações farmacêuticas contendo o nitrocomposto.

Palavras-chave: Nitrocompostos. Ciclodextrina. Dendrímeros. Eletroquímica.

ABSTRACT

Nitroaromatic compounds are very used in the pharmaceutical industry for their known biological properties. One of the probable mechanisms of action of this class of compounds may be involved in redox reactions. The identification of nitro and its products, for a technique simple, sensitive and low cost technique such as electrochemical techniques, is fundamental, because through them it is possible to analyze the solubilization process of these compounds in association with some encapsulating agents. A feature of nitro compound studied, 2 - [(4-nitrophenyl) amino] -4,5,6,7-tetrahydro-4H-benzo [β] thiophene-3-carbonitrile, (6CN10) is its low solubility in water, which justifies its combination with substances such as cyclodextrin and dendrimers, such as PAMAM. The formation of an inclusion complex between 6CN10 and β-cyclodextrin and 6CN10 and PAMAM 3rd generation was evaluated in this work through electrochemical and spectroscopic techniques. The electrochemical system was composed of three electrodes, Ag/AgCl/Cl⁻ saturated (reference), platinum (auxiliary), glassy carbon with and without modification with carbon nanotubes (NTC) or gold (Au) (working) in a buffered medium pH 7.03 with and without a cosolvent and a Na₂SO₄ solution of 0.2 mol L⁻¹. Also was performed spectroscopic studies by UV-Vis in aqueous-ethanolic medium in different concentrations of β-Cyclodextrin, as well as the characterization of the complex 6CN10: PAMAM in methanolic solution. The studies demonstrated that the 6CN10 has standard reduction mechanism of nitroaromatic in potential within the expected range for compounds with biological activity its mechanism of action may be associated with the redox process. The first analysis showed the interaction of 6CN10 as β-CD and the influence of time in this process. By forming a self-assembled monolayer (SAM) of β-CD-SH on the Au electrode it was possible to determine the equilibrium constant between the complex 6CN10:β-CD with value $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Already by spectrophotometric methods, the constant was $7,86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Regarding the PAMAM the first results verified the influence of time on complex formation between 6CN10:PAMAM, reaching the optimum time of 30 minutes. Then With the increasing variations in the concentration of 6CN10 it was possible to determine the equilibrium constant ($K_F = 5,61 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) between the complex 6CN10:PAMAM, in NTC sensor. It is observed that the obtained value is relatively higher in comparison with the electrochemical constant for the complex 6CN10:β-CD. This favoring behavior 6CN10:PAMAM complex can also be observed by the values of LD and LQ obtained, which were, respectively, $1,49 \times 10^{-6}$ and $4,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to the complex with PAMAM and $1,83 \times 10^{-6}$ and $6,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to β-CD. When the SAM of PAMAM-MUA was used the constant obtained was of $2,16 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. In characterizing the 6CN10:PAMAM complex per UV-Vis, the results show that a higher amount than the number of PAMAM ramifications (32 ramifications) and of the 6CN10 interacted, suggesting that the nitro interacted of different forms with PAMAM. Both encapsulating agents demonstrated efficiency for complex formation with the compound under study, but PAMAM presented subtle advantage. However both could be used for the development of different pharmaceutical formulations containing the nitro compound.

Keywords: Nitrocompounds. Cyclodextrin. Dendrimer. Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.....	21
Figura 2 –	Estrutura química do 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10).....	23
Figura 3 –	Voltamograma de pulso diferencial de bissensor de dsDNA em ausência e presença de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 6CN10.....	24
Figura 4 –	a) Voltamogramas cíclicos de 6CN10 em diferentes concentrações de oxigênio b) Curva de I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio.....	25
Figura 5 –	Estrutura molecular e propriedades de α -, β - e γ -CD.....	26
Figura 6 –	Representação de uma molécula genérica de dendrímero com quatro gerações.....	28
Figura 7 –	Estrutura do PAMAM 3G.....	30
Figura 8 –	Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla.....	32
Figura 9 –	Esquema da cinética de formação de SAM; a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento de adsorção e organização, até a formação final da monocamada auto-organizada.....	33
Figura 10 –	Voltamograma cíclico para um sistema reversível de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 6 mmol L^{-1} e KNO_3 1 mol L^{-1} , com destaque para os parâmetros mais importantes.....	35
Figura 11 –	(a) Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial, a corrente é amostrada em 1 e 2 e a diferença entre elas é que é registrada: $\Delta I = I_{(2)} - I_{(1)}$. (b) Voltamograma de VPD.....	36
Figura 12 –	Substituição da hidroxila na molécula de β -CD pelo grupo tosila.....	39

Figura 13 –	Substituição do grupo tosila pelo grupo tiol.....	40
Figura 14 –	Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.....	41
Figura 15 –	Preparo da SAM de MUA + PAMAM 3G em superfície de ouro.....	43
Figura 16 –	Reações de oxirredução do 6CN10.....	44
Figura 17 –	VC do 6CN10 em meio aquoso-etanólico, eletrodo de carbono vítreo, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	47
Figura 18 –	Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigênio.....	48
Figura 19 –	6CN10 sem o co-solvente em solução de tampão fosfato pH 7.....	49
Figura 20 –	Solução de tampão fosfato com 6CN10 após encapsulação por β -ciclodextrina.....	49
Figura 21 –	VC do 6CN10 na ausência e presença de β -ciclodextrina.....	50
Figura 22 –	VC do 6CN10 na presença de β -ciclodextrina em função do tempo..	51
Figura 23 –	VC registado em eletrodo de carbono vítreo modificado com gel de quitosana β -CD-NanoAu, em solução de tampão fosfato pH 7,03 em diferentes concentrações do 6CN10 (10^{-6} a $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).....	52
Figura 24 –	Voltamogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (a), $\text{Fc-CO}_2\text{H}$ (b) em eletrodo de ouro modificado com β -CDSH + MUA. Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte a $0,01 \text{ V s}^{-1}$	53
Figura 25 –	VPD registado em solução de Na_2SO_4 a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do 6CN10 ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em eletrodo de Au modificado com β -CDSH+MUA. Inserção: determinação de constante de equilíbrio entre 6CN10: β -CD.....	54
Figura 26 –	Determinação da constante de equilíbrio do complexo 6CN10: β -CD de acordo com a equação Benesi - Hildebrand em diferentes comprimentos de onda. $[\text{6CN10}] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (5% v / v de EtOH); $[\beta\text{-CD}] = 5,0 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de contato de 2h.....	56

Figura 27 – VC do 6CN10 em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vitreo modificado com NTC e PAMAM, em função do tempo.....	59
Figura 28 – VC do 6CN10 em diferentes concentrações (3×10^{-6} mol L ⁻¹ até 10^{-4} mol L ⁻¹), em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vitreo modificado com NTC e PAMAM. Inserção: Determinação da constante de equilíbrio da Nitro:PAMAM	60
Figura 29 – VC do 6CN10 em diferentes concentrações (10^{-5} mol L ⁻¹ até $1,4 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹), em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vitreo modificado com NTC e PAMAM.....	61
Figura 30 – Reações envolvidas na redução de um derivado nitro.....	62
Figura 31 – Cromatogramas gasoso dos produtos eletrogerados da redução do 6CN10 (a) e do 6CN10 e associação com PAMAM 3G (b).....	62
Figura 32 – Voltamograma cíclico para o 6CN10 em diferentes concentrações (7×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L ⁻¹) com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAMG3. Tampão Fosfato pH 7,03, 5% de etanol, $v=0,05 \text{Vs}^{-1}$	64
Figura 33 – Voltamograma cíclico para o 6CN10 em diferentes concentrações (7×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L ⁻¹) com eletrodo de ouro e PAMAM G3 em solução. Tampão Fosfato pH 7,03, 10% de etanol, $v = 0,05 \text{V s}^{-1}$	65
Figura 34 – Curva analítica gerada através dos valores de concentração e corrente da 6CN10 com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G3. Tampão Fosfato pH 7,03, 5% de etanol, $v=0,05 \text{Vs}^{-1}$	66
Figura 35 – Estudo espectroscópico, para caracterização do complexo entre o 6CN10 em diferentes concentrações (1×10^{-6} mol L ⁻¹ até 4×10^{-5} mol L ⁻¹) com PAMAM 3G (10^{-5} mol L ⁻¹)	67
Figura 36 – Curva de calibração do 6CN10 em diferentes concentrações (1×10^{-6} mol L ⁻¹ até 1×10^{-4} mol L ⁻¹), em metanol, versus as absorbâncias 288nm.....	68
Figura 37 – Tipos de ligações possíveis com dendrímeros (Representado em um dendrímero de 3ª geração).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro aproximados dos dendrímeros PAMAM (G0 – G7).....	29
Tabela 2 – As constantes de dissociação e de formação de complexos 6CN10: β -CD após 2 h de contato obtidas a partir da equação Benesi-Hildebrand.....	57
Tabela 3 – Números de moléculas incorporadas para cada complexo analisado.....	68
Tabela 4 – Dados referente aos estudos com eletrodo de carbono vítreo e ouro modificados.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -CD	alfa-ciclodextrina
β -CD	beta-ciclodextrina
β -CDSH	beta-ciclodextrina tiolada
β -CD-NanoAu	beta- ciclodextrina com nanopartículas de ouro
β -CDTos	beta-ciclodextrina tosilada
γ -CD	gama-ciclodextrina
6CN10	2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
A	Ampère
A	Termo independente (equação da reta)
B	Coefficiente angular (equação da reta)
CD(s)	ciclodextrina(s)
CGTases	ciclodextrina glicosiltransferases
DMF	N,N-dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
E _{1/2}	Potencial de meia-onda
E	Potencial

EDC	N-3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
Eq.	Equação
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
GX	Geração (onde X corresponde ao número da geração)
H ₂ O	Água
H	Hora
I	Corrente
I _{max}	Corrente de pico máxima
I _{pa}	Corrente de pico anódica
I _{pc}	Corrente de pico catódico
K _D	Constante de Dissociação
K _F	Constante de formação
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M _r	Massa molecular relativa
MUA	Ácido 11-mercaptoendecanóico

mV/s	millivolts por segundo
n	número de elétrons/ número de sítio ativo
NTC	Nanotubo de Carbono
P.A.	Pureza Analítica
PAMAM	Poliamidoamina
PAMAM 3G	Poliamidoamina 3 ^a geração
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coeficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
SAM	“Self Assembled Monolayers” (Monocamadas auto-organizadas)
S _B	Desvio padrão médio
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
V	Volts
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VPN	Voltametria de Pulso Normal

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔI	Diferença entre a corrente da linha base e da de pico no voltamograma
ΔA	Varição da absorvência
$\Delta \epsilon$	Varição da absortividade molar
Λ	Absorbância
ν	Velocidade de varredura de potencial
μA	Microampère
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Au	Ouro
Au-SH	Ligação ouro e grupo tiol
e^-	Elétron
g	Gramas
mL	Mililitro
mg	Miligrama
nm	Nanômetro
$R - NHOH$	Hidroxilamina derivado do R-NO ₂
$R - NO_2^{\ominus}$	o radical aniônico derivado do R-NO ₂

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Nitrocompostos	20
1.2	Ciclodextrinas (CDs)	25
1.3	Dendrímeros	27
1.3.1	Poliamidoamina (PAMAM)	28
1.4	Nanotubos de Carbono (NTC)	31
1.5	Monocamadas auto-organizadas (SAM's)	32
1.6	Métodos eletroquímicos	34
1.6.1	Voltametria cíclica	35
1.6.2	Voltametria de pulso diferencial	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	Geral	37
2.2	Específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Reagentes e Solventes	38
3.1.1	Preparação de soluções	38
3.1.2	Síntese de β -Ciclodextrina tiolada	39
3.1.2.1	Primeira etapa: síntese de β -Ciclodextrina-tosilada (β -CDTos)	39
3.1.2.2	Segunda etapa: síntese de β -Ciclodextrina-tiolada (β -CD-SH)	39
3.1.3	Síntese da nanopartícula de ouro + β -ciclodextrina tiolada	40
3.2	Estudos eletroquímicos	40
3.2.1	Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de ouro	41
3.2.2	Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de β -CDSH + MUA	42
3.2.3	Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de PAMAM + MUA	42
3.2.4	Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubo de Carbono (NTC)	43
3.2.5	Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Gel de Quitosana e β -Ciclodextrina tiolada-Nano ouro (β -CD-SH-NanoAu)	43
3.3	Estudos por Eletrólise e extração dos produtos eletrogerados	43
3.4	Estudos Espectroscópicos	44
3.4.1	Análise Espectroscópica dos Complexo 6CN10: β -CD	44
3.4.2	Preparação e Caracterização do Complexo PAMAM:6CN10	45
3.4.3	Preparação da curva de calibração	45

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1	Comportamento eletroquímico do 6CN10	46
4.1.1	Processo de adsorção em superfície eletródica.....	46
4.2	Estudos de encapsulação com β-CD	48
4.2.1	Avaliação da interação de 6CN10 com β -CD em solução.....	48
4.2.2	Eletrodo de carbono vítreo modificado com gel de quitosana+ β -CDSH-NanoAu.....	51
4.2.3	Eletrodo de ouro modificado com a formação da SAM de β -CDSH + MUA.....	53
4.2.4	Determinação espectrofotométrica da constante de formação aparente do complexo β -CD:6N10.....	55
4.3	Estudos de encapsulação com PAMAM 3G	57
4.3.1	Interação 6CN10:PAMAM 3G em eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC e PAMAM 3G na superfície.....	58
4.3.2	Interação 6CN10:PAMAM em eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM 3G.....	64
4.3.3	Estudos espectroscópicos de formação do complexo de 6CN10:PAMAM 3G.....	67
4.4	Avaliação geral das diferentes modificações empregados no estudo do 6CN10	70
5	CONCLUSÃO	72
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO	83

1 INTRODUÇÃO

Uma gama de medicamentos está disponível no mercado para as mais diversas enfermidades, contudo o número de pesquisas nesse campo encontra-se em contante desenvolvimento. Uma infinidade de novas moléculas é sintetizadas, reinventadas, e remodeladas na intenção de descobrir a cura para doenças que ainda não tem tratamento eficaz ou para aquelas em que o fármaco apresenta diversos efeitos colaterais. Da descoberta de uma molécula até o produto final na forma de um medicamento, leva bastante tempo, investimento financeiro e muitos estudos, pois vários fatores devem ser avaliados para uma nova molécula como: toxicidade, via de administração, mecanismo de ação, solubilidade entre outros.

A solubilidade, de modo especial, é uma propriedade muito importante, tem influência direta na farmacocinética de um composto com atividade biológica. A baixa solubilidade acarretará em problema desde absorção à eliminação. Desse modo, torna-se importante a busca por alternativas, que consigam aumentar a solubilidade dos fármacos sem interferir em sua atividade farmacológica. Há uma vasta literatura que relata a possibilidade de complexação entre moléculas orgânicas lipofílicas de tamanho apropriado, íons inorgânicos, e outras espécies, como ciclodextrina, dendrímeros e lipossomas.

Ciclodextrinas (CDs) pertencem a uma classe de receptores naturais; são oligômeros cíclicos constituídos de unidades de glicopirranose capazes de formar complexos de inclusão estáveis ou nanoestruturas supramoleculares organizadas, com uma variedade de moléculas, em sua cavidade hidrofóbica via interações não covalentes (ROJAS et al., 1995). Dentre suas aplicações, destaca-se a possibilidade de solubilização de substratos lipofílicos em meio aquoso, reconhecimento molecular, estabilização de substâncias, bem como o surgimento de sistemas de liberação de fármacos no alvo de ação (WANG et al., 2006; FERANCOVÁ; LABUJA, 2001; CHMURSKI; TEMERIUŠZ; BILEWICZ, 2004). O estudo da formação de complexos (host-guest) com ciclodextrinas pode ser feita por técnicas eletroquímicas que confirmam a formação desses complexos através das mudanças observadas na corrente de pico, bem como no potencial de redução e/ou oxidação após inclusão do substrato (HROMADOVÁ et al., 2009).

Os dendrímeros pertencem a uma classe de polímero que ganhou destaque no século XXI, só ditos como polímeros tridimensionais, altamente simétrico, com uma

matriz monodispersas que lhe garante características singulares (TOMALIA; CHENG 2012; SHCHARBIN; KLAJNERT; BRYSEWSKA, 2009; TOMALIA; CHRISTENSEN; BOAS, 2012). São constituídos de unidades de repetição, como polímeros tradicionais, mas se diferenciam deles por duas características principais: não são sintetizados por reações de polimerização mas passo-a-passo, resultando em estruturas perfeitamente definidas e altamente reproduzíveis, aliado a esse são polímeros muito ramificados (CAMINADE; TURRIN, 2014). Todo esse contexto justifica a variada aplicabilidade dos dendrímeros, dentre elas a possibilidade de interação com algumas moléculas, por meios de seus grupos funcionais específicos, conferindo a elas diversas propriedades como uma maior estabilidade, liberação controlada, reconhecimento celular, catálise e solubilização de compostos lipofílicos (YAM et al., 2006; ABRUNÃ, 2014; POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014)

No decorrer desse trabalho, pretende-se analisar o perfil eletroquímico do 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10), composto com atividade antifúngica, porém baixa solubilidade em água. Como a CD tem grande afinidade por compostos nitroaromáticos (TREDICI et al., 2010), será avaliado o processo de inclusão do composto frente a CD em solução, quanto em superfície eletródica, usando as monocamadas altamente organizadas (SAM's), através da funcionalização da molécula de ciclodextrina, com grupos tiól. Juntos a elas também será avaliado um outro agente encapsulante que vem despertando grande interesse nos estudos de desenvolvimento de nosso fármaco, os dendrímeros.

Os nanotubos de carbono (NTC) tem aplicações em circuitos micro e nanoeletrônicos. Apresentam uma propriedade singular que os tornam extremamente atraentes para o papel de sensores químicos, em geral, como também na detecção eletroquímica, em particular, sendo utilizados como material eletródico alternativo para diversos analitos.

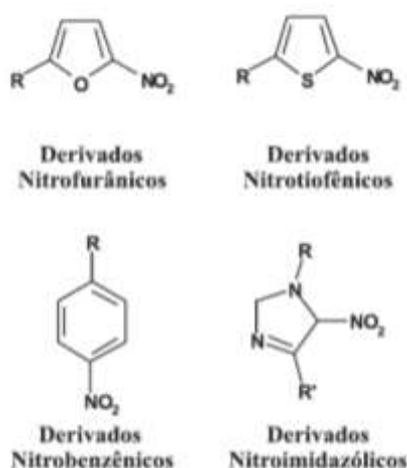
1.1 Nitrocompostos

O grande interesse no estudo de nitrocompostos dar-se pela grande variedade de aplicação desses compostos. De maneira mais intensa no início da década de 40, com a inserção e emprego de nitrocompostos na terapêutica, muitos compostos desta classe foram sintetizados e testados frente a diversas doenças, tais como: doença de chagas, hipertensão, leishmaniose, infecções bacterianas, câncer, entre outras

(HORROCKS et al., 2007; REMERS; BEARS,1997). Os primeiros relatados de toxicidade foram na década de 50 e 60 (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2007), mas até hoje alguns desses fármacos são usados no combate a alguns tipos de infecções em humanos.

O emprego dos nitrocompostos não limita-se a um única classe terapêutica, possuem diversas aplicações clínicas dentre as quais: antianginosos (dinitrato de isossorbida, nitroglicerina), anti-hipertensivos (nifedipina, nitredipina e nisoldipina), anticoagulante (acenocumarol), sedativo hipnótico (nitrazepan), analgésico narcótico (clonitiazina), anti-inflamatório (nimesulida), anti-histamínico H-2 (ranitidina), antibacterianos (cloranfenicol, metronidazol, nitrofural, nifuroxazida), antineoplásicos (nitacrina, 1-(1,5-dicloropentano-3-il)-4-nitrobenzeno) e antiparasitários (metronidazol, tinidazol, secnidazol, benzinidazol e nifurtimox) (TAVARES et al., 1999; KOROLKOVAS; FRANÇA, 2007; RANG et al., 2011; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2007). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas fundamentais, das classes de nitrocompostos com atividade biológica de maior relevância.

Figura 1 - Subestruturas químicas fundamentais de nitrocompostos empregados em terapêutica.

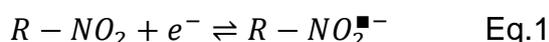


Fonte: Adaptado de PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009

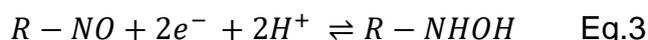
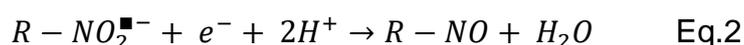
O grupo nitro ligado a molécula é fundamental para a atividade biológica desta classe de compostos como resultado de alterações na estabilidade do mesmo, intermediada por interações entre o nitrocomposto e o seu alvo na biofase. Por ser um forteceptor de elétrons, o grupo nitro reduz facilmente em nível molecular levando a essas alterações, contribui também, o efeito de ressonância entre o nitrocomposto

e os dois átomos de oxigênio de sua estrutura (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). A maioria dos compostos nitratos tem por mecanismo de ação a biorredução enzimática, levando a formação de radicais livres com toxicidade preferencial para células bacterianas e parasitárias.

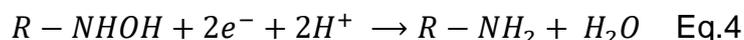
Os nitrocompostos aromáticos podem sofrer redução por duas vias diferentes, dependendo da presença ou ausência de oxigênio (meio aeróbio ou anaeróbio, respectivamente), porém ambas situações, a primeira etapa é a redução de um elétron para a formação do ânion radical nitro (ABREU; FERRAZ; GOULART, 2002; NÚÑEZ-VERGARA et al., 2001; MOSCOSO et al., 2011; PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009; CAVALCANTI et al., 2004; BOELSTERLI et al., 2006)



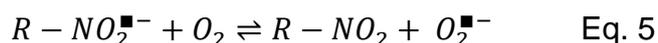
Observa-se nas equações abaixo, que em condições anaeróbicas, o nitro radical pode sofrer sucessivas reações e produzir os derivados nitroso (RNO) e hidroxilaminico (R-NHOH):



Ocorrendo a adição de mais dois elétrons pode formar a amina correspondente:



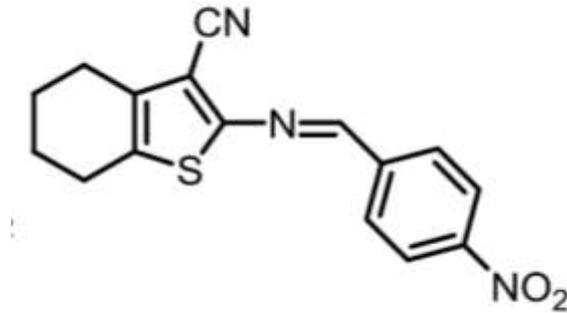
Em condições aeróbicas, o nitro ânion radical reage com oxigênio, regenerando o composto, conforme equação 5.



O nitro radical e a hidroxilamina formados são os principais metabólitos do processo de redução enzimático.

No presente trabalho, o nitroaromático estudado (Figura 2) foi o 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10), um novo nitrocomposto lipofílico da classe dos nitrobenzenos como atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* e cepas de *Criptococcus neoformans* (MENDONÇA JUNIOR et al 2011; ELEAMEN, et al., 2016). Sabe-se que o grupo nitro confere ao anel aromático maior estabilidade química e resistência à degradação microbiana (DENG et al., 2012), além do grupo tiofeno que tem destaque como promissor fármaco em diversas classe terapêutica, como leshimanicida, ao qual o próprio 6CN10 apresentou uma leve atividade, passível de ser melhor explorada (RODRIGUES et al., 2015).

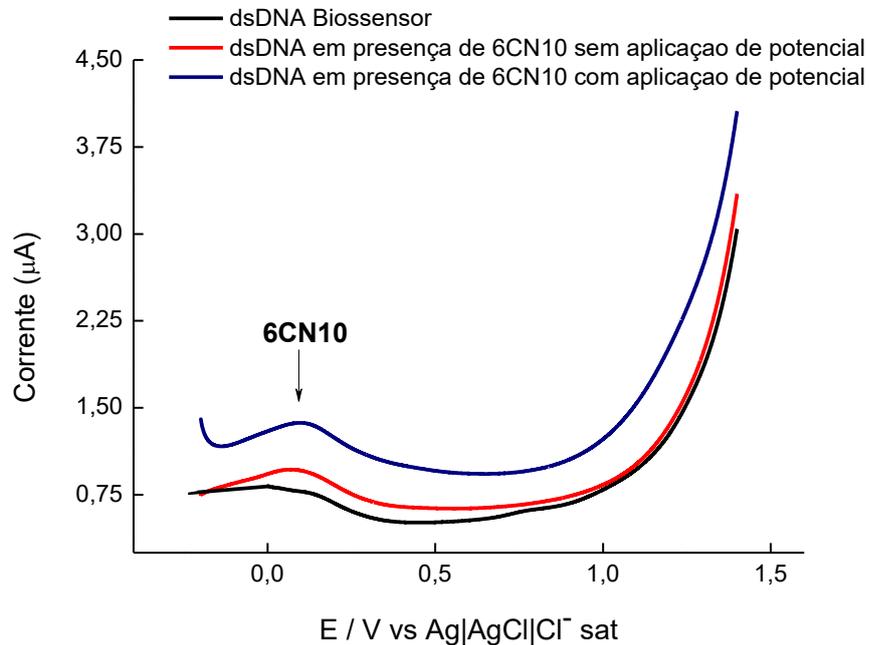
Figura 2 - Estrutura química do 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10).



Fonte: Autora, 2016

Esse nitroderivado foi testado frente a biossensor de dsDNA que pode ser usado para estudos de interação entre a macromolécula e compostos biologicamente ativos, como uma tentativa de elucidar o mecanismo de ação do composto. Pode-se observar que não há mudança muito evidente no comportamento voltamétrico do dsDNA, quando em presença do 6CN10, além da presença da onda de oxidação do 6CN10, $E_{pa} = 0,08V$ (Figura 3). A interação do 6CN10 foi testada direta e indiretamente, diretamente sem aplicação de potencial durante o condicionamento e indiretamente aplicando o potencial referente a redução do grupo nitro do 6CN10, para certificar que além do grupo nitro seus derivados de redução também interagem fracamente com o DNA (Figura 3) (SILVA, 2014).

Figura 3 - Voltamograma de pulso diferencial de biossensor de dsDNA em ausência e presença de 1×10^{-5} mol L⁻¹ de 6CN10.

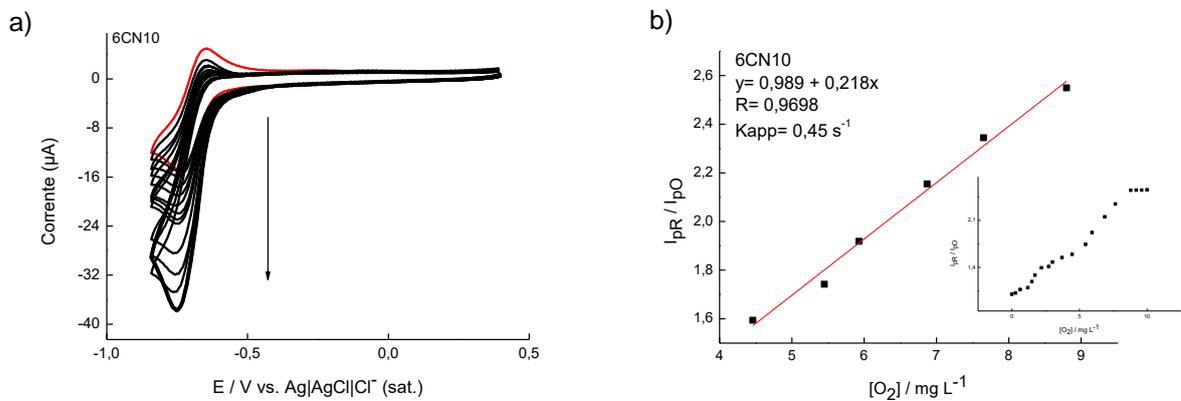


Fonte: SILVA, 2014

Como o 6CN10 apresentou uma fraca interação com o DNA, conclui-se que seu mecanismo de ação antifúngica, provavelmente, não se dá por esta via e além disso a chance deste fármaco ser tóxico ao organismo humano são menores que a maioria dos nitrocompostos (SILVA, 2014).

Por outro lado, o 6CN10, apresentou capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio com conseqüente indução do estresse oxidativo, quando avaliado em presença de oxigênio, o potencial de redução do nitroaromático ($E_{pc1} = -0,737$ V) sofre um deslocamento de 14 mV para valores mais negativos ($E_{pc1} = -0,751$ V). O aumento da concentração de oxigênio promoveu um aumento na corrente de pico da primeira onda de redução (I_c) e desaparecimento da onda de oxidação (I_a), perfil característico de processo catalítico. O efeito sobre a corrente de redução foi analisado em função da concentração de oxigênio (Figura 4a), como constante de associação aparente entre o radical eletrogerado na redução do nitro com oxigênio, sendo a mesma igual a $0,45$ s⁻¹ (Figura 4b) (SILVA, 2014).

Figura 4 - a) Voltamogramas cíclicos de 6CN10 em diferentes concentrações de oxigênio b) Curva de I_{pR} / I_{pO} em função da concentração de oxigênio.



Fonte: SILVA, 2014

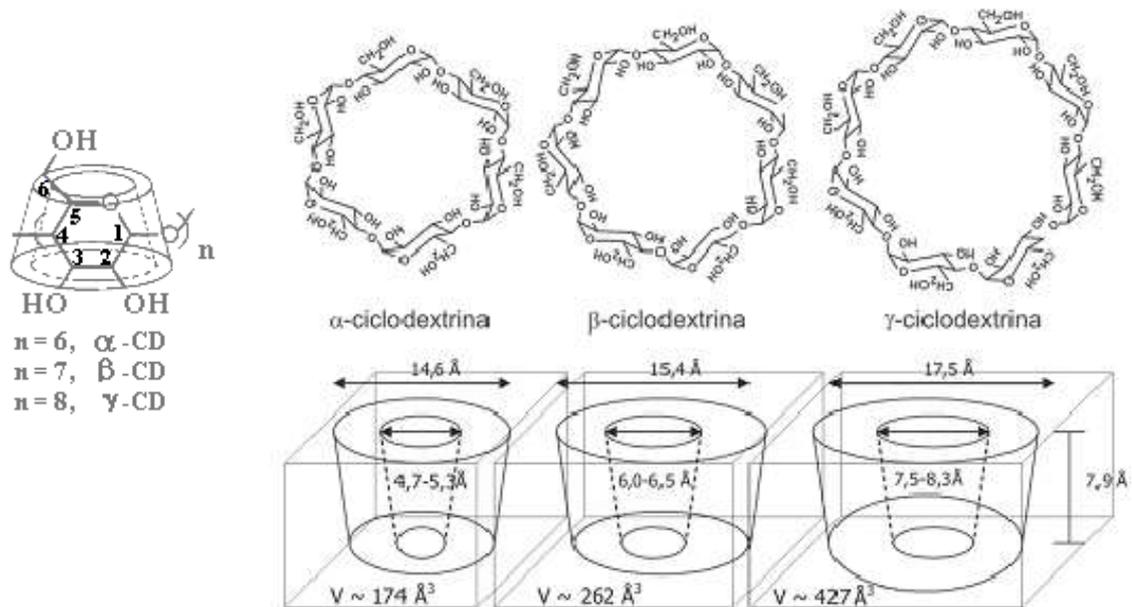
A formação dos radicais livres provenientes do processo de biorredução do grupo nitro pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA, sendo um dos prováveis mecanismo de ação do 6CN10 (SILVA, 2014).

1.2 Ciclodextrinas (CDs)

As ciclodextrinas pertencem à família dos oligossacarídeos cíclicos naturais ou semi-sintéticos. São carboidratos complexos, composta por unidades de glicose (α -D-glucopiranosose) unidas por ligação α -1,4. α -, β - e γ -CDs estão entre as CDs mais importantes de ocorrência natural, diferenciam-se pelas unidades de glicose que as constituem, sendo respectivamente com 6, 7 e 8 unidades (Figura 5) (CEREDA, 2003; VENTURINI, et al., 2008).

As CDs foram descobertas em 1891, pelo pesquisador francês A. Villiers, ao descrever a ação de enzimas então denominadas CD glicosiltransferases (CGTases), sobre o amido. Com base nessa descoberta em 1903, Franz Schardinger, um microbiologista alemão, descreveu o processo de preparação e isolamento por meio da digestão bacteriana do amido da batata das formas α -CD e β -CD, distinguindo-as através do método do iodo. (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura molecular e propriedades de α -, β - e γ -CD.



Fonte: Adaptado de ROJAS et al., 1995; VENTURINI et al., 2008

As CDs foram descobertas em 1891, pelo pesquisador francês A. Villiers, ao descrever a ação de enzimas então denominadas CD glicosiltransferases (CGTases), sobre o amido. Com base nessa descoberta em 1903, Franz Schardinger, um microbiologista alemão, descreveu o processo de preparação e isolamento por meio da digestão bacteriana do amido da batata das formas α -CD e β -CD, distinguindo-as através do método do iodo. (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008).

Um grande esforço tecnológico foi empreendido nos últimos anos para reduzir os custos de produção das CDs, viabilizando sua aplicação farmacêutica. Atualmente, as ciclodextrinas são uma nova classe de excipientes farmacêuticos, sendo possível encontrar mais de 35 medicamentos disponíveis no mercado que apresentam em sua formulação ciclodextrina, seja sólida ou em solução, como insulina, nimesulida, omeprazol, itraconazol, meloxicam e nicotina (ELEMEN et al., 2016).

Sua estrutura química e espacial confere propriedades físico-químicas singulares, como a capacidade de solubilizar-se em meio aquoso e, além disso, encapsular no interior de sua cavidade moléculas hidrofóbicas, devido as hidroxilas primárias do resíduo sacarídico voltadas para extremidade estreita do cone e as hidroxilas secundárias voltadas para a extremidade larga. Em meio aquoso, os grupos hidroxila formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água, levando a

hidratação ao redor da molécula de CD dissolvida. (CUNHA-FILHO; SÁ BARRETO, 2009; LOFTSSON; MASSON, 2001; BREWSTER; LOFTSSON, 2007). A cavidade é levemente não-polar, ocupada também por moléculas de água, que são rapidamente substituídas por um substrato menos polar do que a água, resultando em um estado energeticamente mais favorável, esse processo ocorre por difusão (VENTURINI et al., 2008).

As CDs têm a capacidade de formar complexos por inclusão com moléculas orgânicas de tamanho apropriado e íons inorgânicos nos mais diversos meios. O processo de encapsulação ocorre sem que haja formação de ligações químicas ou mudanças estruturais, interações do tipo "hóspede-hospedeiro" (host-guest). A formação desses complexos é de grande importância, devido às inúmeras aplicações, dentre as quais se destacam a alta seletividade molecular (discriminação quiral), maior estabilidade, inclusive de radicais eletrogerados, a diminuição da volatilidade de perfumes, redução ou eliminação de gostos ou odores desagradáveis de fármacos e alimentos; o aumento na solubilidade de substratos lipofílicos em meio aquoso e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade, a redução na irritabilidade (ocular ou gastrointestinal), na toxicidade e na liberação *in loco* de compostos biologicamente ativos, prevenindo interações e incompatibilidade (FERREIRA et al., 2010; WANG et al., 2006).

O estudo da formação de complexos (*host-guest*) com ciclodextrinas pode ser feito por técnicas eletroquímicas que confirmam a formação desses complexos através das mudanças observadas na corrente de pico, bem como no potencial de redução e/ou oxidação após inclusão do substrato (HROMADOVÁ et al, 2009).

1.3 Dendrímeros

Dendrímeros podem ser definidos como uma classe de materiais poliméricos. Começou a ser estudado no final da década de 1970, mas só recebeu essa nomenclatura, em 1985, por Tomalia, o nome dendrímeros origina de "*dendron*" palavra grega que significa árvore ou ramo e "*meros*" que significa parte. Eles podem ser descritos como macromoléculas nanométricas tridimensionais, altamente ramificados que se desenvolvem a partir de um núcleo central, seguido de uma série de unidades de repetição (gerações) e os grupos funcionais terminais. As propriedades únicas, tais como tamanho uniforme, alto grau de ramificação, a

aplicações, principalmente biomédicas (ESFAND; TOMALIA, 2001; MADAAN et al., 2014; MOHAMMADIFAR ; KHARAT; ADELI, 2015). Foram sintetizados a primeira vez em 1984 por Tomalia e colaboradores, partindo de dois possíveis núcleos, seja etilenodiamina ou amoníaco, com quatro ou três pontos de ramificação respectivamente, sendo aminas primárias na superfície e terciárias nos pontos de ramificação (SHI; MAJOROS; BAKER, 2005) e foi também o primeiro a ter toda a sua série, da geração 0 a 10, produzida (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014).

O tamanho de PAMAM varia de 1 a 13 nm de diâmetro da geração 0 a geração de 10, ou seja, a cada geração é observada uma mudança de cerca de 1 nm no diâmetro molecular do dendrímero (Tabela 1). Tem se estabelecido então que os dendrímeros tem um aumento linear em seu diâmetro a cada geração, e em contra partida, um aumento exponencial de seus grupos funcionais. Resultando numa menor distância entre os grupos funcionais e uma menor flexibilidade de sua estrutura com o aumento da geração (SCOTT; WILSON; CROOKS, 2005; MOHAMMADIFAR ; KHARAT; ADELI, 2015; BAHADIR; SEZGINTURK, 2016). A quantidade de gerações do PAMAM também influencia sua forma, dendrímeros de menor geração (G0-G4) no plano tem a forma elíptica, enquanto os de geração maior (G5-G10), tendem para formar uma conformação esférica (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014). O número de geração também afeta o peso molecular, tamanho e o número dos grupos de superfície, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro aproximados dos dendrímeros PAMAM (G0 – G7).

Geração	Nº de grupos NH ₂ na periferia	Fórmula Molecular	Peso Molecular(g/mol)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
0	4	C ₂₄ H ₅₂ N ₁₀ O ₁ S ₂	609	1,5
1	8	C ₆₄ H ₁₃₂ N ₂₆ O ₁₂ S ₂	1522	2,2
2	16	C ₁₄₄ H ₂₉₂ N ₅₂ O ₂₂ S ₂	3304	2,9
3	32	C ₃₀₄ H ₆₁₂ N ₁₂₂ O ₆₀ S ₂	7001	3,6
4	64	C ₆₂₄ H ₁₂₅₂ N ₂₅₀ O ₁₂₄ S ₂	14307	4,5
5	128	C ₁₂₆₄ H ₂₅₃₂ N ₅₀₆ O ₂₅₂ S ₂	28918	5,4
6	256	C ₂₅₄₄ H ₅₀₉₂ N ₁₀₁₂ O ₅₀₉ S ₂	58140	6,7
7	512	C ₅₁₀₄ H ₁₀₂₁₂ N ₂₀₄₂ O ₁₀₂₀ S ₂	116585	8,1

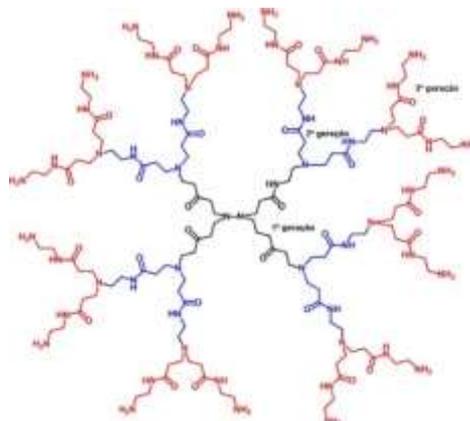
Fonte: Adaptado de TOMALIA (2004); POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ (2014); BAHADIR; SEZGINTURK (2016)

Outro destaque importante e que se mostra relacionado as gerações é a toxicidade do PAMAM. Dentre os dendrímeros, eles são o que apresentam menor toxicidade, contudo esse perfil aumenta conforme o número de gerações, passando a ter efeitos *in-vitro* comprovados a partir da quarta geração, apesar disso muitos estudos já mostram diversas alternativas viáveis para driblar essa toxicidade (MANDAAN et al., 2013; POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014; SORSAK et al., 2015).

Como já mencionado PAMAM tem em seu interior espaços vazios que mudam de acordo com sua geração. Nesses locais, o PAMAM assim como as ciclodextrinas também podem fazer interações do tipo “hóspede-hospedeiro” (host-guest), onde a molécula hidrofóbica pode interagir com os dendrímeros por ligações de hidrogênio, ligação iônica ou de interações hidrofóbicas, além desse tipo de interação PAMAM pode fazer ligações covalentes e não-covalentes por meio de seus grupos aminas primários e terciários (ESFAND; TOMALIA, 2001; SATIJA; SAI; MUKHERJI, 2011; MANDAAN et al., 2013; CAMINDE; TURRIN, 2014; POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014; MOHAMMADIFAR ; KHARAT; ADELI, 2015).

A capacidade de PAMAM para encapsular moléculas hidrofóbicas dentro dos espaços vazios em seu interior e para formar micelas com estas moléculas é a principal razão para aumento da solubilidade atribuído a esse sistema (MOHAMMADIFAR ; KHARAT; ADELI, 2015). Diante disso, justifica a utilização desse agente encapsulante como uma alternativa e de modo comparativo as ciclodextrinas, como um meio de aumentar a solubilidade do composto estudado e levando em consideração estudos prévios e o perfil de toxicidade optou-se por desenvolver os estudos como o PAMAM de 3ª geração (PAMAM 3G), exemplificado na Figura 7:

Figura 7 - Estrutura do PAMAM 3G



Fonte: Adaptado de BAHADIR; SEZGINTURK, 2016.

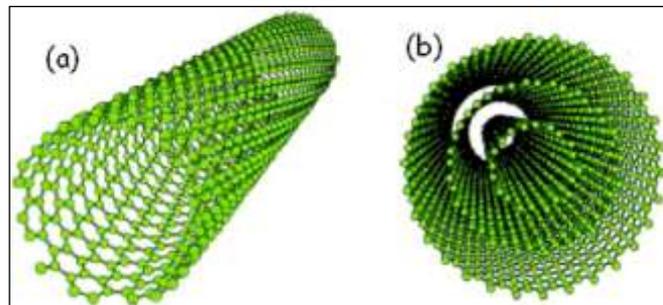
1.4 Nanotubos de Carbono (NTC)

Alotropia é o fenômeno onde uma substância simples varia o número de átomos, ou sua estrutura cristalina, formando outra substância, os nanotubos de carbono são alótropos do carbono. Não há certeza quando a primeira observação dessas estruturas, as primeiras imagens datam de 1952, feitas através de microscopia eletrônica de transmissão onde foram identificados objetos carbonáceos comprovadamente tubulares e com diâmetros nanométricos (MONTHIOUX; KUZNETSOV, 2006).

Os nanotubos de carbono são caracterizados pelo enrolamento de uma ou várias folhas de grafeno de forma concêntrica, com diâmetro em dimensões nanométricas, com cavidade interna oca (Figura 8). Os NTCs podem ser divididos em dois grupos: os NTCs de camada única (“SWCNTs da sigla em inglês: “single-walled carbon nanotubes”) (Figura 8a) e os de camadas múltiplas (MWCNTs da sigla em inglês: “multi-walled carbon nanotubes”), constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite espaçados de 0,34-0,36 nm um do outro (Figura 8b) (RAO *et al.*, 2001).

Os NTCs são considerados materiais estratégicos e com variadas aplicabilidades tecnológicas, devido a propriedades como: alta resistência química, baixa densidade, resistência à alta temperatura e à oxidação. Quanto ao transporte elétrico, podem apresentar características metálicas semicondutoras ou até supercondutoras, de acordo com sua estrutura, diâmetro e quiralidade. Sua constituição básica do retículo são as ligações covalentes C-C, uma das mais fortes na natureza, como nas camadas do grafite. Portanto, nos nanotubos o carbono se apresenta com uma hibridação sp^2 (AJAYAN, 1999). Estão entre as estruturas mais robustas conhecidas, com altíssima resistência mecânica, flexibilidade e resistência à ruptura, quando dobrados ou torcidos. A elevada massa molecular relativa (M_r) e as forças de van der Waals que mantem os tubos unidos fazem com que os NTC existam como pacotes em seu estado nativo, tornando-os insolúveis na maioria dos solventes e pode limitar sua manipulação, processamento, caracterização, e aplicação prática dos mesmos. (FERREIRA, 2003; LIU *et al.*, 2008).

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla.



Fonte: Adaptado de LIU et al., 2008.

Dentro da eletroquímica, NTC é usado para preparar eletrodos quimicamente modificados (EQM-NTC). Os NTC podem modificar a eficiência do eletrodo, devido a suas propriedades químicas e físicas, tais como área superficial, muitos grupos funcionais aderidos à superfície, atividade catalítica, dentre outras. A notável sensibilidade da condutividade da superfície adsorvida com NTCs permite seu uso como sensores altamente sensíveis (nanoescala). Estas propriedades tornam o NTC extremamente atraente para uma ampla gama de biossensores eletroquímicos, devido a sua boa resposta de corrente. A literatura descreve algumas metodologias de preparo de EQM-NTC, dentre elas a dispersão de NTC em vários solventes (JIANG *et al.*, 2008; WANG, 2005).

Levando em conta as propriedades eletroquímicas de NTC, como também as propriedades de dendrímeros PAMAM 3G, foi possível sugerir a modificação de um eletrodo de carbono vítreo com uma matriz de NTC + PAMAM 3G para o estudo do 6CN10, onde os NTC serviram como suporte para que o PAMAM 3G seja aderido à superfície do eletrodo além de incorporar a vantagem da transferência de elétrons mais rápida, em razão da presença de NTC na interface do eletrodo aumentando a área eletroativa, pois se trata de tubos de carbono, ótimos condutores elétricos, esperando que assim o processo de encapsulação e solubilização da substância pelo PAMAM 3G seja favorecido.

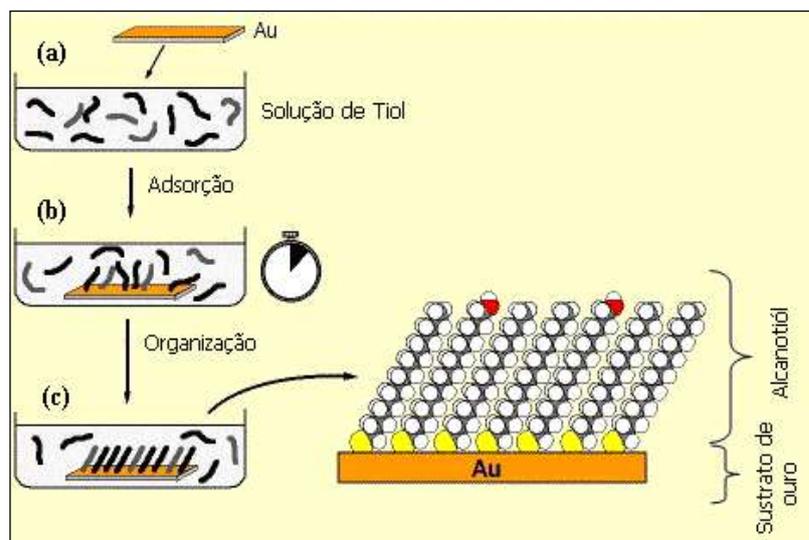
1.5 Monocamadas auto-organizadas (SAM's)

Camada de espessura molecular formada por moléculas quimicamente ligadas à superfície de um sólido com alto grau de organização, definição aplicada a

Monocamada auto-organizada (SAM, do inglês “*Self Assembled Monolayer*”). Sua estrutura é melhor entendida quando avaliada em partes, sendo três partes principais: um grupo ativo com forte interação por um substrato, uma cadeia alquila para promover estabilidade à montagem devido às interações de van der Waals e um grupo funcional na cauda da cadeia alquila que desempenha um papel importante em termos de acoplamento de uma biomolécula à monocamada (ARYA et al., 2009).

Para a formação dessas camadas auto-organizadas, o grupo mais empregado e estudado é, indubitavelmente, de tióis sobre superfícies de ouro, devido à estabilidade da ligação Au-SH. Um emparelhamento perfeito entre alcanotióis resulta em uma estrutura altamente ordenada e inclinada de 20 a 30 graus em relação à normal. A técnica de imobilização de SAM sobre a superfície do eletrodo por meio da imersão em solução é realizada em um período de 24 horas, em que o acoplamento do adsorbato é uma etapa rápida, quando comparada ao processo de organização, que ocorre de maneira muito mais lenta, conforme esquema apresentado na figura 9. (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; CANCINO, 2008; FERREIRA et al., 2010; ECKERMANN et al., 2010).

Figura 9 - Esquema da cinética de formação de SAM; a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento de adsorção e organização, até a formação final da monocamada auto-organizada.



Fonte: Adaptado de FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003

Inúmeras técnicas podem ser empregadas para avaliar a estrutura, formação e estabilidade das SAM's, dentre elas: ressonância de plásmon de superfície (SPR), espalhamento Raman (SERS), microscopia de varredura eletroquímica (SECM),

também por polarização modulada da espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho (PM IRRAS), microbalança de cristal de quartzo (QMC) e eletroquímicas (SKODA et al., 2009; MOREL et al., 2010).

O artifício de produção das monocamadas auto-organizadas, já foi descrito em associação aos agentes encapsulantes usados neste trabalho, como uma alternativa de produção de sensores eletroquímicos, estáveis, reprodutíveis e que permitam um estudo com maior precisão e determinação de constante de formação dos complexos mais confiáveis (JICSINSZKY; IVÁNYI, 2001; TANG et al., 2005; BUSTOS et al., 2008)

1.6 Métodos eletroquímicos

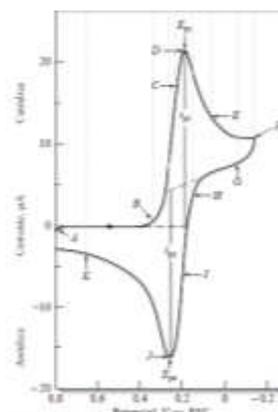
Eletroquímica pode mimetizar as principais reações oxidativas que ocorrem no corpo humano, proporcionando uma boa aproximação do que ocorre *in vivo* (KOVACIC; SOMANATHAN, 2014), logo os estudos que envolvem a transferência de elétrons auxiliam na compreensão de vários processos que ocorrem no meio biológico, ajudando assim o desenvolvimento das áreas químico-farmacêutica, farmacológica, toxicológica e biomédica, em geral, através por exemplo do desenvolvimento de biossensores. Os processos de oxirredução estão relacionados como principais mecanismos desenvolvidos na célula viva, desde processo metabólico aos de defesa, sendo intermediados por enzimas presentes em todos os organismos vivos. Esses processos requerem um ambiente redox que permita realizar eficientemente sua função baseados em uma série de transformações redox e não redox, catalisadas por enzimas ou não, e envolvendo transferência de elétrons e de átomos, aliado a tudo isso encontra-se um complexo grupo de proteínas, peptídeos e genes. Qualquer mudança nesse delicado equilíbrio pode causar alteração na homeostase celular ou em outros ambientes (MOURA, 2008).

A eletroquímica trata de fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que ocorrem heterogeneamente na superfície do eletrodo, ou homogeneamente em solução (BRETT; BRETT, 1996). O processo eletroquímico fundamentar-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir substratos de interesse, sendo o método padrão para o estudo das reações redox. Quando comparada a química convencional, a eletroquímica destaca-se pelo baixo gasto de reagentes, além do fácil controle de variáveis que, combinadas de formas diversas, levam à técnicas eletroquímicas particulares (MELLO, 2007; MOURA, 2008).

1.6.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica importante e amplamente empregada no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reação, na observação e no acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos. A voltametria cíclica é uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é submetido a variação, numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtem-se como resposta a essa perturbação, no caso de uma transferência eletrônica reversível, um par de picos, catódico e anódico (Figura 10). Um experimento envolvendo VC pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos (SKOOG, 2005).

Figura 10 - Voltamograma cíclico para um sistema reversível de $K_3Fe(CN)_6$ 6 mmol L⁻¹ e KNO_3 1 mol L⁻¹, com destaque para os parâmetros mais importantes.



Fonte: SKOOG, 2005

Pode avaliar-se o processo eletródico ocorrido, através dos seguintes dados: potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) ou de pico a meia altura de onda (E_{p2}). Com esses dados, é possível inferir se o processo de transferência de elétrons é reversível ou não, a presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, a caracterização do fenômeno que controla a corrente de pico, se a velocidade de varredura influencia no potencial e na corrente e também determinar a concentração de substâncias eletroativas (FLETCHER; GREEF, 2001; SKOOG, 2005).

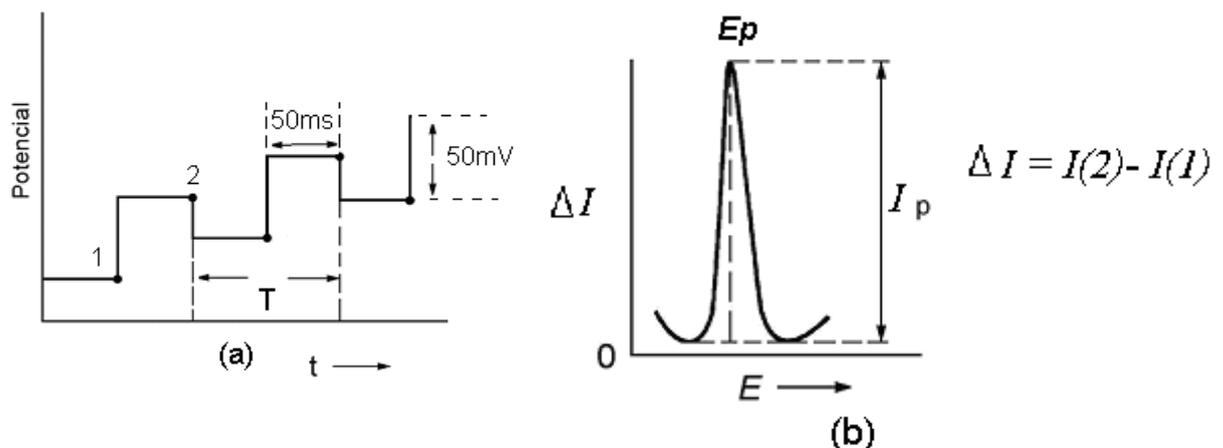
1.6.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica eletroanalítica semelhante à VPN, porém geralmente é mais sensível, e apresenta limites de detecção

significativamente menores, devido a uma melhora da corrente faradáica ou uma diminuição na corrente de carga não-faradáica na VPD. Como na VPD, na voltametria de pulso diferencial normal, escolhe-se um valor base de potencial, normalmente onde não há reação faradáica, e aplica-se ao eletrodo. A partir desse valor, aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento de amplitude sempre igual, a corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração vai normalmente de 5 ms a 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2 – 4 s. (BRETT; BRETT, 1996; SKOOG, 2005).

O potencial-base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos de mesma intensidade. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e registra-se a diferença entre as duas correntes; isso diminui a percepção da corrente capacitiva. Os valores das duas correntes estão separados de dois valores de potenciais por cerca de 50 mV a 100 mV (que na verdade é o valor da amplitude do pulso superposto). A duração de cada pulso varia normalmente entre 5 – 50 ms. O intervalo entre os pulsos é de 0,5 – 4s. Os pulsos de potencial são superpostos em uma rampa de potencial em forma de degraus com potencial linearmente crescente, quando em instrumento digital, conforme Figura 11.

Figura 11 - (a) Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial, a corrente é amostrada em 1 e 2 e a diferença entre elas é que é registrada: $\Delta I = I(2) - I(1)$. (b) Voltamograma de VPD.



Fonte: SKOOG, 2005

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil voltamétrico do 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila por meio de técnicas eletroquímicas, bem como a formação de complexo de inclusão com β -CD e PAMAM.

2.2 Específicos

Estudar o comportamento eletroquímico do nitroaromático nitrotiofênico, em meio prótico, visando obter informações que auxiliem na compreensão do seu mecanismo de ação.

Verificar a formação de complexos por inclusão entre β -ciclodextrina e PAMAM com 6CN10 através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e pulso diferencial, de modo a identificar a influência da concentração dos agentes encapsulantes, do tempo de interação e com a associação de nanopartículas.

Determinar a K_f dos complexos formados entre β -ciclodextrina e 6CN10, bem como do complexo PAMAM com 6CN10 e caracteriza-los através de técnicas espectroscópicas de UV-Vis.

Observar a resposta eletroquímica do 6CN10, frente a β -ciclodextrina tiolada associada a nano ouro, dispersa em uma matriz de gel de quitosana na superfície do carbono vítreo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

O 6CN10 ($M = 311,35 \text{ g mol}^{-1}$) foi gentilmente sintetizado e cedido pelo Professor Doutor Thiago de Mendonça Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. A β -ciclodextrina (β -CD) foi adquirida da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). O ácido acético (HOAc) foi obtido da Cromoline® (Diadema, Brasil). O Acetato de sódio (NaOAc), tiouréia, hidróxido de sódio (NaOH), *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH), sulfato de sódio (Na_2SO_4) fosfato de sódio diidratado (Na_2HPO_4) e fosfato de sódio monoidratado (NaH_2PO_4) têm procedência da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido clorídrico (HCl) e o ácido ferrocenocarboxílico (Fc-CO₂H) foram obtidos da Alfa Aesar (Tewksbuty, MA, USA). Ácido 11-mercaptoendecanóico (MUA) foi obtido da Merck. Nanotubos de carbono (NTC) de parede múltipla (>95 % pureza, 10-20 nm de diâmetro), foram adquiridos da NanoLab, Inc. (Brighton, MA, USA) e Sigma Aldrich. Desta última também foram adquiridos o Poliaminoamina de geração 3 e *N*-3-dimetilaminopropil):*N'*-etilcarbodiimida (EDC). O *N,N*-dimetilformamida extra seco foi adquirido da Acros Organics® (New Jersey, USA). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 M Ω cm) obtidos de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

3.1.1 Preparação de soluções

Soluções-estoque de 6CN10 foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em álcool etílico P.A. imediatamente antes de sua utilização no estudo eletroquímico.

Para os estudos fizeram-se necessários o uso de alguns tampões. Tampão fosfato pH 7,03 como força iônica de 0,222 foi preparado a partir da mistura de 30,5 mL de Na_2HPO_4 e 19,5 mL de NaH_2PO_4 , ambos na concentração de $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, completando o volume para 100 mL com água deionizada. A verificação do pH das soluções tampão foi realizado em pHmetro da Quimis.

3.1.2 Síntese de β -Ciclodextrina tiolada

A β -ciclodextrina tiolada foi sintetizada em duas etapas de acordo com as metodologias utilizadas por Jicsinszky; Iványi (2001) e Tang et al (2005) respectivamente, conforme descrito a seguir. A primeira etapa foi caracterizada pela substituição das hidroxilas da molécula pelo grupo tosila. Na segunda etapa da síntese, o grupo adicionado à estrutura na primeira etapa, caracterizado como um bom grupo abandonador foi substituído pelo grupo tiol, formando então a estrutura de interesse a ser estudada.

3.1.2.1 Primeira etapa: síntese de β -Ciclodextrina-tosilada (β -CDTos)

Inicialmente, pesou-se 1g da β -ciclodextrina cristalina e em seguida dissolveu-se em 25 mL de água contendo 0,052g de hidróxido de sódio. Nessa solução foi adicionado lentamente 0,2g de cloreto de tosila dissolvido em éter (3 mL). A mistura foi deixada sob agitação por 12h e em seguida a solução foi neutralizada com ácido clorídrico (pH 6) e deixada no refrigerador durante 24h. Após esse tempo a solução aquosa foi removida e o sólido foi filtrado, lavado com etanol P.A e seco a vácuo por 24h apresentando um rendimento de 54%.

Figura 12 - Substituição da hidroxila na molécula de β -CD pelo grupo tosila.



Fonte: Adaptado de JICSINSZKY; IVÁNYI, 2001

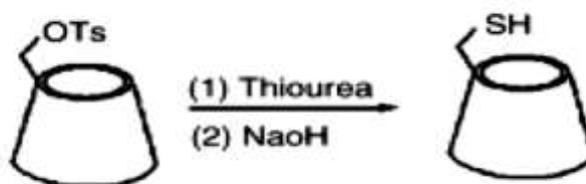
3.1.2.2 Segunda etapa: síntese de β -Ciclodextrina-tiolada (β -CD-SH)

Inicialmente 250 mg da β -CDTos foi dissolvida em 12,5 mL de uma solução de metanol contendo 275 mg de tiouréia. A mistura permaneceu em refluxo durante 2 dias à 70°C. Em seguida, a solução aquosa metanólica foi evaporada a vácuo à 40°C. Após a evaporação foi adicionado ao resíduo 3,75 mL de metanol PA, seguida de agitação durante 1h. Logo após, a solução foi filtrada a baixo vácuo e o resíduo foi

seco em dessecador a vácuo por 12h e o sólido seco foi transferido para um balão e dissolvido em 8,75mL de uma solução de NaOH a 10% (m/V) e mantida a 50°C durante 5h.

O pH da solução foi ajustado para 2 pela adição de HCl 10% (v/v). 3,125 mL de tricloroetileno foi adicionado à solução e deixado sob agitação durante 12h. O precipitado foi filtrado e seco em dessecador a vácuo por 24h.

Figura 13 - Substituição do grupo tosila pelo grupo tiol.



Fonte: Adaptado de JICSINSZKY; IVÁNYI, 2001

3.1.3 Síntese da nanopartícula de ouro + β -ciclodextrina tiolada

Inicialmente foram preparadas duas soluções:

- **Solução 1** – 1,4 mL de solução aquosa HAuCl_4 + 3,6 mL DMSO;
- **Solução 2** – 18,9 mg de NaBH_4 dissolvido em 5 mL de DMSO sob agitação e adicionado 13,1 mg de β -CD-SH.

A solução 2 após estar solúvel foi adicionada gota a gota (lentamente) a solução 1 Até passar de amarelo a vinho, indicando a formação das nanopartículas de ouro. A solução foi deixada sob agitação por 24 h e, após esse tempo, 10 mL de CH_3CN foi adicionado para precipitar o coloide e, em seguida a misturada foi centrifugada com objetivo de separar o solvente do coloide.

O sobrenadante foi coletado e o precipitado lavado com 15 mL de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{DMSO}$ (1:1 v/v) e novamente centrifugado.

Novamente, o sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado 2 vezes com 15 mL de etanol P.A., isolado por centrifugação e seco sob vácuo a 50°C, apresentando rendimento de 3,24 mg.

3.2 Estudos eletroquímicos

Os experimentos eletroquímicos foram realizadas através do equipamento potenciostato/galvanostato, PGSTAT (AUT73222) da Autolab®.

Para os estudos eletroquímicos utilizou-se um sistema de três eletrodos (Figura 14): eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 1,6 mm) e eletrodos de ouro (BAS, diâmetro 1,6 mm), ambos como eletrodo de trabalho; eletrodo de fio de platina, como auxiliar; e Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) da BAS, como eletrodo de referência.

Experimentos voltamétricos foram realizados em cela eletroquímica com 10 mL de meio misto, tampão fosfato/etanol (9:1 v/v) para o estudo do perfil voltamétrico do nitrocomposto. Para os estudos de interação com β -CD e PAMAM utilizou-se 10 mL de tampão fosfato pH 7,03 e 10 mL de meio misto aquoso de Na₂SO₄/etanólico (9:1) para β -CDSH. Os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Origin 8.0®.

Figura 14 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.



Fonte: ANDRADE, 2013

3.2.1 Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de ouro

O eletrodo de carbono vítreo (BAS) passou por uma limpeza mecânica. Foi polido com alumina (0,3 μ m) e lavado abundantemente com água, antes de ser levado ao ultrassom por 30 s em etanol P.A.

Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste com uma solução de ferri/ferrocianeto de potássio em KCl 0,1 mol L⁻¹, para verificar a área eletroativa do eletrodo, bem como a eficiência do polimento. Em seguida, o eletrodo foi utilizado no estudo eletroquímico de 6CN10, na presença e ausência de β -CD e de interação com PAMAM. Exceto nos estudos em que a superfície do eletrodo estava modificada, foi necessário polir a superfície do eletrodo a cada nova varredura, pois a substância adere facilmente a superfície do eletrodo dificultando as leituras posteriores.

O processo de limpeza da sua superfície do eletrodo de ouro realizou-se por uma limpeza química, onde o eletrodo de ouro foi exposto à chama de um maçarico até o rubor. Logo em seguida, o eletrodo foi imerso em clorofórmio a fim de se evitar o processo de oxidação do Au.

3.2.2 Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de β -CDSH + MUA

A metodologia utilizada no preparo da SAM foi realizada segundo CHOI *et al.* (2005).

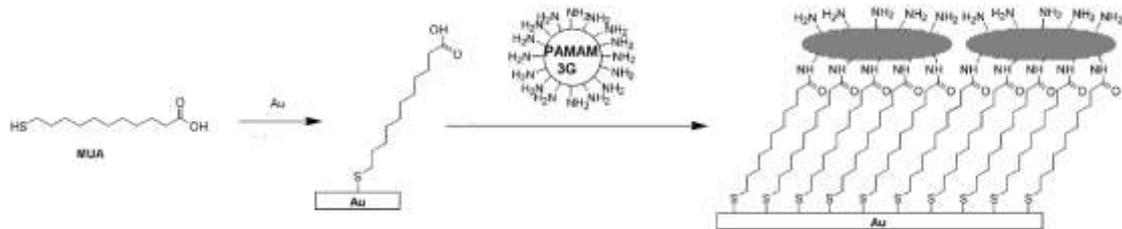
Depois de limpo, o eletrodo foi introduzido em uma solução contendo β -CDSH:Fc-CO₂H:MUA (2:2:1 m/m/m) em uma mistura dos solventes DMSO:EtOH:H₂O (5:3:2 v/v/v). Inicialmente, o eletrodo foi imerso numa solução de β -CDSH dissolvida em DMSO, desaerada com N₂ sob agitação. Em seguida adicionou-se o Fc-CO₂H solubilizado em EtOH. O eletrodo permaneceu na solução por 1 hora para formação do complexo entre Fc-CO₂H e a cavidade da β -CDSH. Depois disso, a MUA e a água foram adicionadas, sendo novamente desaerada com N₂. O eletrodo permaneceu em repouso nessa solução por 24h. Antes dos experimentos voltamétricos os eletrodos foram lavados abundantemente com EtOH e água.

3.2.3 Eletrodo de Ouro Modificado com SAM mista de PAMAM + MUA

A metodologia utilizada no preparo da SAM mista de PAMAM + MUA foi realizada segundo Bustos *et al.* (2008).

O eletrodo de ouro limpo foi imerso em uma solução metanólica de MUA a 1×10^{-3} mol L⁻¹ a temperatura ambiente por 24h. Em seguida, o PAMAM de geração 3 (PAMAM 3G) foi ligado quimicamente ao eletrodo de ouro funcionalizado, promovendo a criação de ligações amida do tipo NH(CO) entre o COOH terminais do MUA e grupos amina (NH₂) dos dendrímeros através da imersão do eletrodo em solução metanólica contendo 5×10^{-3} mol L⁻¹ EDC (para promover a criação de ligações amida) e 21×10^{-6} mol L⁻¹ de PAMAM por 12h a temperatura ambiente. Antes dos experimentos voltamétricos, os eletrodos foram lavados abundantemente com metanol.

Figura 15 - Preparo da SAM de MUA + PAMAM 3G em superfície de ouro.



Fonte: Adaptado de YAM et al., 2006

3.2.4 Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubo de Carbono (NTC)

1,0 mg de NTC foi suspenso em 1,0 mL de DMF e disperso no ultrassom por 2h antes de serem depositadas sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo. Desta suspensão foram utilizados 10 μL (adicionados 1 μL por vez) . O eletrodo foi levado à estufa a 80°C por 10 min (a cada adição), depois uma alíquota de 10 μL de PAMAM 3G foi adicionada na superfície do eletrodo modificado com NTC, e secada sobre fluxo de gás N_2 antes de seguir com a análise.

3.2.5 Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Gel de Quitosana e β -Ciclodextrina tiolada-Nano ouro (β -CD-SH-NanoAu)

500 mg de quitosona foi solubilizada em 15 mL de uma solução de ácido acético 1 mol L^{-1} mais 1 mL de ácido acético concentrado por cerca de 2h sob agitação constante até formar um gel homogêneo. Em seguida o eletrodo de carbono vítreo previamente limpo, foi mergulhado no gel por 2h sob refrigeração (4°C), e seco em temperatura ambiente. Para finalizar a modificação 20 μL da solução de β -CD-SH-NanoAu (1mg de β -CD-SH-NanoAu em 1mL de tampão fosfato), foram adicionado na superfície do eletrodo, 10 μL por vez seco sobre fluxo de gás N_2 a cada adição.

3.3 Estudos por Eletrólise e extração dos produtos eletrogerados

Nesse estudo o 6CN10 será avaliado em ausência e presença de PAMAM 3G, onde o mesmo será reduzido até sua completa exaustão.

Os estudos foram realizados em uma meio misto composto por tampão fosfato pH 7,03 e 30% de etanol P.A. Inicialmente uma pré-eletrolise foi feita apenas com a solução aquosa-etanólica, com aplicação do potencial de redução do nitro durante

600 s, ressaltando a importância de agitar e desarear a solução antes do procedimento (por cerca de 10 minutos).

Posteriormente a substância foi adicionada a uma concentração de $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a solução, novamente é fundamental agitar e desarear a solução antes do procedimento (por cerca de 10 minutos) e durante toda eletrólise, após os 10 minutos iniciou-se a análise com aplicação do mesmo potencial que na pré-eletrolise, anota-se a carga inicial e segue o experimento até que a carga estabilize ou atinja 10% do valor da carga inicial.

Esse experimento foi repetido dentro dos mesmos parâmetros, só que em presença de PAMAM numa concentração cerca de 2 vezes maior que a da substância.

Ao final da eletrólise, os produtos eletrogerados foram extraído da solução, pela adição de 30 mL de éter, sendo 10 mL por vez adicionado a solução aquosa e a cada adição a fase orgânica era separada da fase aquosa com um auxílio de um funil de separação, ao final do processo a solução aquosa anteriormente amarelada estava límpida. O éter foi então extraído com evaporador à vácuo. O produto foi então armazenado a 4°C até a análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. As amostras foram analisadas em um Cromatógrafo à gás (Thermo Scientific/Trace1300) acoplado ao Espectrômetro de Massas (Thermo Scientific/ISQ Single Quadrupole) (GC/MS), na Central Analítica da Universidade Federal de Pernambuco.

3.4 Estudos Espectroscópicos

3.4.1 Análise Espectroscópica dos Complexo 6CN10: β -CD

Uma solução aquosa etanólica (20% v/v) de 6CN10 ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada. Sete alíquotas de 5 mL dessa solução foram retiradas (para erlenmeyers) e misturadas com quantidades apropriadas de β -CD para obter concentrações de $5,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de β -CD. A mistura foi agitada (170 rpm) por 2 horas, a 25°C . Aliquotas de 3 mL foram colocadas em cubetas de quartzo (10mm/3,5 mL) da Agilent® para análise. Os valores de absorção foram medidos na faixa de comprimento de onda de 202 a 467 nm (202, 290, 384 e 467 nm). Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu Multispec-1501 UV-VIS.

3.4.2 Preparação e Caracterização do Complexo PAMAM:6CN10

Adaptando a metodologia descrita por Devarakonda e colaboradores (2007), preparou-se o complexo PAMAM:6CN10

1,56 mg de 6CN10 foi dissolvido em 5mL de metanol em um balão volumétrico, resultando em solução estoque com concentração de 10^{-3} mol L⁻¹, a partir desta e da solução de PAMAM 3G foram adicionados volume específicos para obtenção de soluções com proporções molares iniciais de PAMAM:6CN10 em 5 mL de metanol de 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:32. As misturas reacionais foram agitadas (150 rpm) durante 24 h no escuro e em seguida evaporou-se a 40°C o metanol a vácuo. Aos precipitados foram adicionados 5 mL de água deionizada. Posteriormente, esta suspensão foi agitada (150 rpm) no escuro durante 24 h e o nitrocomposto 6CN10 não complexado foi removido por filtração utilizando filtros de acetato de celulose 0,2 µm (Minisart, Sartorius Stedin) e, em seguida, a solução aquosa contendo o complexo PAMAM:6CN10 congelada no freezer por 12h e liofilizado para remover a água. O produto foi solubilizado em metanol e analisado com um auxílio de um espectrômetro Shimadzu Multispec-1501 UV-VIS em cubeta de quartzo (10mm/3,5 mL) da Agilent®, que também foi usado para construção de uma curva de calibração do 6CN10, necessária para determinar a quantidade de moléculas incorporadas.

3.4.3 Preparação da curva de calibração

Para quantificação do nitrocomposto 6CN10 nas análises foram obtidas curvas de calibração a partir de uma solução mãe de 6CN10 em metanol na concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹. Dando continuidade, sucessivas diluições foram realizadas, para a construção das curvas de calibração, com concentrações variando entre 1×10^{-6} mol L⁻¹ a 1×10^{-4} mol L⁻¹. Os espectros de absorção da 6CN10 no espectrofotômetro UV-Vis foram obtidos a 288 nm, utilizando como branco o sistema de solventes. A metodologia utilizada para quantificação do nitrocomposto 6CN10 foi desenvolvida e validada por Presmich e colaboradores em 2010.

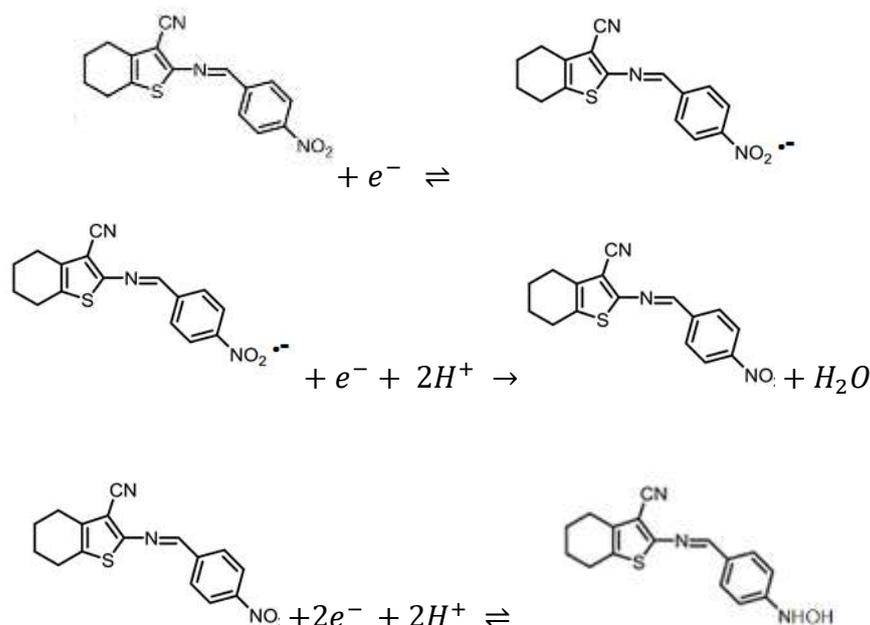
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Comportamento eletroquímico do 6CN10

4.1.1 Processo de adsorção em superfície eletródica

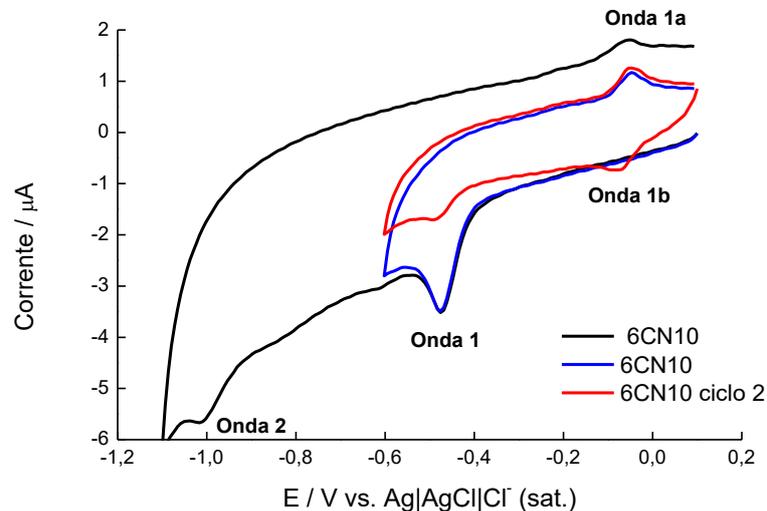
Por sua baixa solubilidade em água, característica comum a alguns nitrocompostos (LIU et al. 2013; PÉREZ-CRUZ et al., 2009), os estudos de 6CN10 por voltametria cíclica em meio prótico (perfil em meio aprótico foi avaliado em trabalhos anteriores) foram realizados em tampão fosfato, pH 7,03 contendo 10% de etanol para promover a solubilidade do composto. Na Figura 17, observa-se o perfil voltamétrico de 6CN10 (10^{-4} mol/L) em meio aquoso-etanólico. Os voltamogramas cíclicos apresentaram um sistema de natureza irreversível, E_{pc1} (onda 1) em $-0,45V$ e um sistema reversível, com E_{pc2} (onda 1a) em $-0,04V$ e E_{pc3} (onda 1b) em: $-0,07V$ a $100mV/s$, que referem-se conforme as equações abaixo (Figura 16) à redução do grupo nitro presente no 6CN10 envolvendo 4elétrons/4prótons com a geração da hidroxilamina que após oxidação produz o sistema reversível hidroxilamina /nitroso observado na segunda varredura.

Figura 16 – Reações de oxirredução do 6CN10.



Fonte: Autora ,2017

Figura 17 - VC do 6CN10 em meio aquoso-etanólico, eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 100$ mV s⁻¹



Fonte: Autora, 2017

Resultados semelhantes foram descritos por MOSCOSO et al. (2011) para o processo de redução do nitrendipino e por TONIN et al. (2009) ao estudar o perfil eletroquímico do benzonidazol, destacando ainda o processo de redução do grupo nitro para a formação da hidroxilamina como um dos principais responsáveis pelo aumento da atividade tripanossomicida do fármaco.

Como já mencionado, este estudo foi realizado em uma célula eletroquímica na presença de gás argônio, com a finalidade de eliminar o oxigênio do meio. Neste caso o valor de $E_{pc1}(-0,45V)$ é mais um fator que sugere que o composto em estudo pode ser biologicamente ativo, já que microorganismos anaeróbios em seus sistemas enzimáticos conseguem reduzir nitrocompostos em valores próximos a $-0,5$ V. A diferença de potencial de redução entre os diversos nitrocompostos resulta numa base importante para o entendimento da toxicidade seletiva para os microorganismos. Adicionalmente, a ativação redutiva em anaeróbios somente é possível em intervalo limitado de potencial de certos sistemas enzimáticos, o que comprova a seletividade de alguns compostos (PAULAI; SERRANO; TAVARES, 2009). Os valores dos potenciais de redução de alguns nitrocompostos podem ser observados na Figura 18. O potencial de redução do grupo nitro de 6CN10 está dentro da faixa ótima para compostos nitrobenzeno (classe a qual pertence) com atividade biológica, inclusive geradoras de espécies oxigenadas reativas (Figura 18).

Figura 18 - Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigênio.



Fonte: TAVARES et al., 1999

A onda 2 em potenciais mais negativos ($E_{pc2} = -1,0$ V), refere-se à redução irreversível do grupo C=N-. Este último processo de redução demonstrou-se independente do processo de redução do grupo nitro, garantindo a reversibilidade do sistema.

4.2 Estudos de encapsulação com β -CD

4.2.1 Avaliação da interação de 6CN10 com β -CD em solução

Como já citado anteriormente, a β -ciclodextrina tem como importante propriedade a formação de complexos por inclusão com moléculas orgânicas, sendo então estudada sua capacidade de interagir com 6CN10 em meio tamponado (pH 7,03).

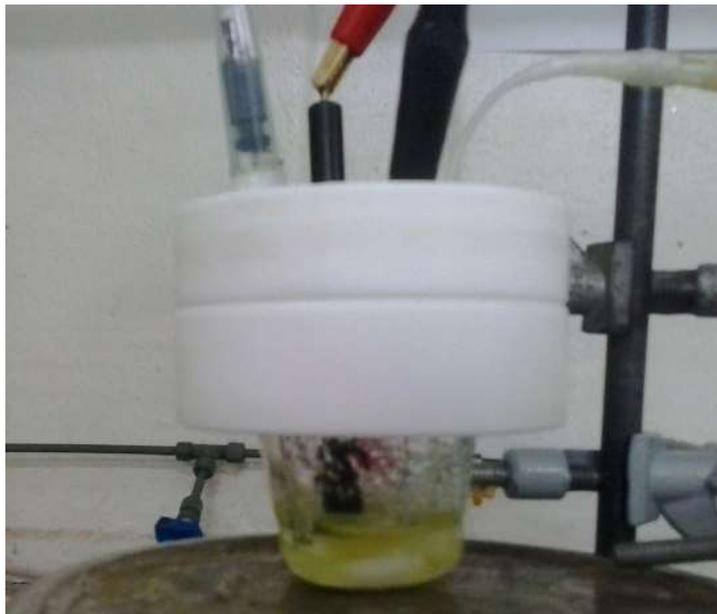
Neste experimento eletroquímico, o 6CN10 (10^{-4} mol/L) foi adicionado sólido ao tampão sem o co solvente etanol (Figura 19) e como esperado, por conta da baixíssima solubilidade do composto no meio, não fora observado qualquer pico de redução e ou oxidação. Entretanto, com adições definidas de β -ciclodextrina, também no estado sólido, os picos de redução da substância foram observados, demonstrando o processo de transferência de fase, que também foi observado pela mudança de cor da solução, sugerindo a interação do composto com β -ciclodextrina (Figura 20). A altura dos picos aumentaram tanto em função do tempo de contato e agitação quanto em função do aumento da concentração de ciclodextrina (Figura 21).

Figura 19 - 6CN10 sem o co-solvente em solução de tampão fosfato pH 7,03.



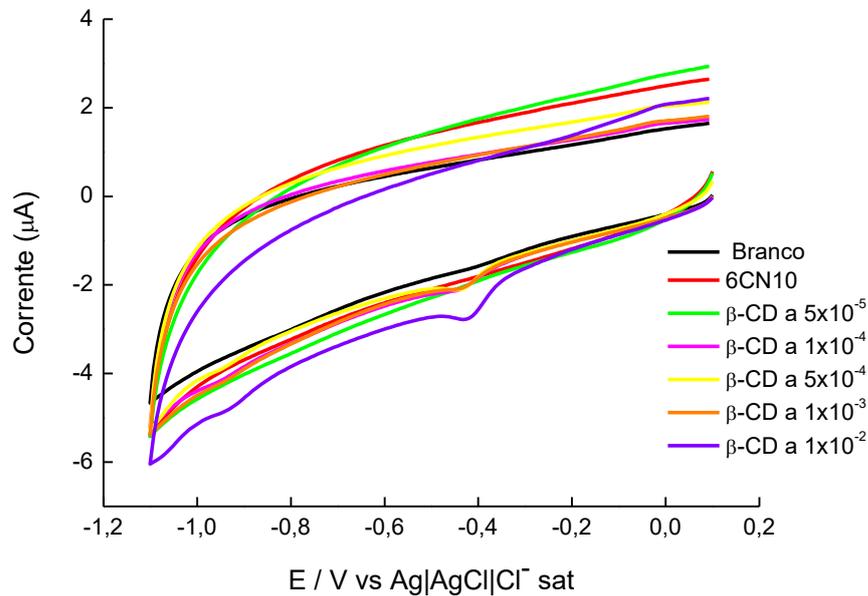
Fonte: Autora, 2017

Figura 20 - Solução de tampão fosfato com 6CN10 após encapsulação por β -ciclodextrina.



Fonte: Autora, 2017

Figura 21 - VC do 6CN10 na ausência e presença de β -ciclodextrina em diferentes concentrações (5×10^{-4} a 5×10^{-2} mol L $^{-1}$).



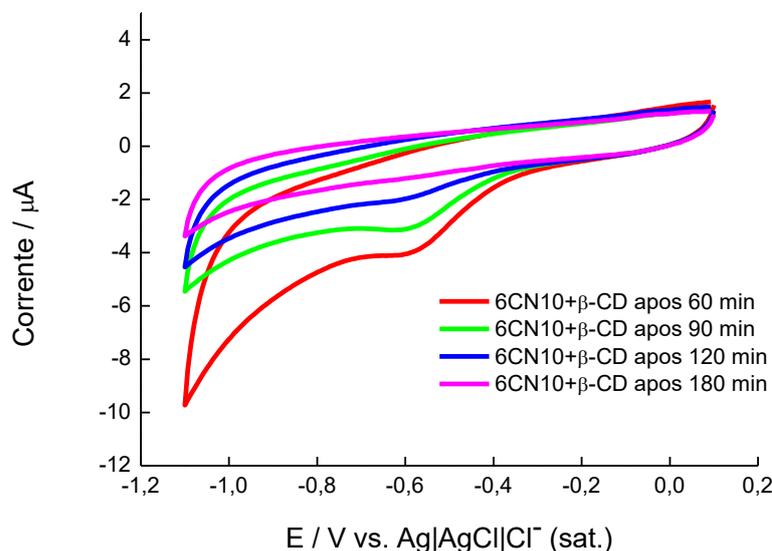
Fonte: Autora, 2017

Em seus estudos LIU et al. (2013) e PÉREZ-CRUZ et al. (2009), obtiveram resultados semelhantes ao avaliar a capacidade das β -CDs de encapsular nitrocompostos. Segundo eles o deslocamento do pico de redução do grupo nitro para potenciais mais negativos, também sugere o processo de interação, pois a β -CD dificulta o processo de redução. O deslocamento de pico observado na presença β -CD é atribuído à mudança no ambiente do grupo nitro quando inserido dentro da cavidade β -CD, levando a estabilização da porção nitro e tornando-o mais difícil sua redução, provavelmente é devido a esse fato também que ocorre a perda da reversibilidade do composto, uma vez na cavidade da β -CD o comportamento eletroquímico de oxidação do nitro é dificultado (SRINIVASAN; STALIN; SIVAKUMAR; 2012) uma vez que seu produto da redução passa a ser mais estável no interior da β -CD. Como mencionado anteriormente a atividade biológica de um nitro derivado pode estar ligada ao ânion nitro radical gerado após a redução ou ao seu derivado hidroxilamínico, o comportamento apresentado no voltamograma da figura 21, mostra que o sistema de interação β -CD:6CN10 é favorável, principalmente se a molécula for pensada como um pró-fármaco cuja a espécie ativa gerada após biorredução enzimática estaria mais estável (ânion nitro radical). Porém se o derivado hidroxilamínico estiver ligado em parte com o mecanismo de ação este poderá ser

afetado, contudo é possível que as interações (Van der Waals) da molécula com a β -CD, possam ser quebradas, liberando o fármaco para completa biorredução enzimática.

Outro estudo eletroquímico de encapsulação também foi realizado. Novamente o 6CN10 (10^{-4} mol/L) foi adicionado sólido em solução tampão sem o co-solvente etanol, apresentando o mesmo comportamento descrito anteriormente. Desta vez uma única concentração de β -ciclodextrina (10^{-4} mol/L), foi adicionada em solução e seu comportamento observado após agitação constante em intervalos de 30 minutos, onde foi possível verificar que depois de 60 minutos o pico catódico correspondente a redução de 6CN10 começa a diminuir até desaparecer completamente (Figura 22). Segundo LIU et al. (2013), uma provável justificativa é que a β -ciclodextrina após esse tempo começa a encapsular também o grupo eletroativo responsável pelo sinal eletroquímico da substância estudada, ou um bloqueio da condutividade elétrica do eletrodo pela β -CD, ou até uma possível instabilidade do composto em solução.

Figura 22 - VC do 6CN10 na presença de β -ciclodextrina em função do tempo.



Fonte: Autora, 2017

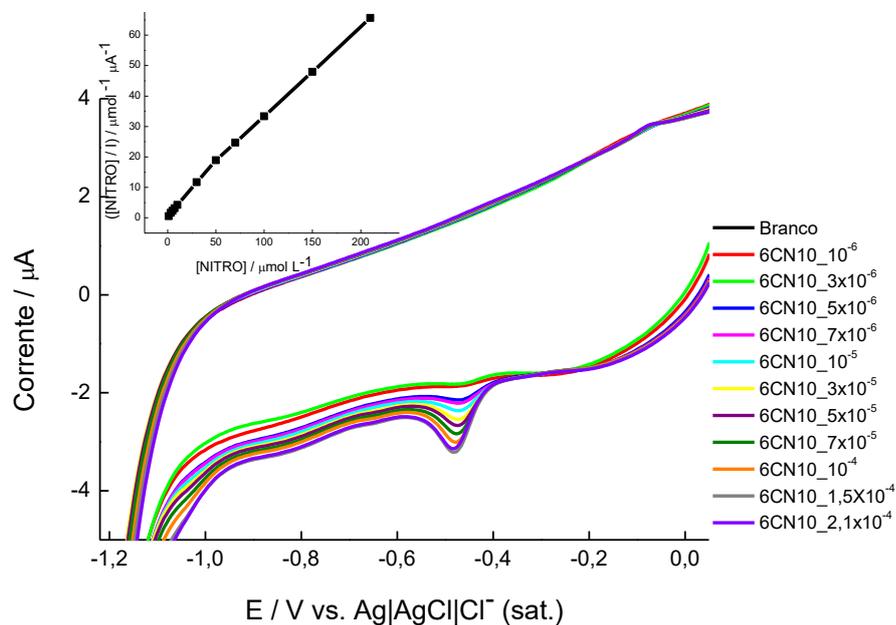
4.2.2 Eletrodo de carbono vítreo modificado com gel de quitosana+ β -CDSH-NanoAu

As nanopartículas são sistemas estáveis que podem se adequar a outras moléculas para melhorar sua eficácia, liberação no alvo de ação e até mesmo a biodisponibilidade de fármaco pouco solúveis. Entre essas nanopartículas, a literatura traz exemplo de associação de β -CD com nanoAu como uma forma de construir

biossensores mais seletivos e sensíveis (CHALLA et al., 2005; ZUO et al., 2008). Diante disso, estudos preliminares foram realizados como o 6CN10 frente a β -CDSH-NanoAu immobilizada numa matriz de gel de quitosona, um biopolímero muito empregado na eletroquímica como suporte para outras moléculas na superfície do eletrodo, que não apresenta sinal redox, mas que apresentam algumas propriedades antimicrobianas que podem corroborar em futuras aplicações clínicas (DASH et al., 2011; Liu et al., 2011).

Na figura 23, observa-se o comportamento eletroquímico do 6CN10 em presença de β -CDSH-NanoAu, variando a concentração de 10^{-6} a $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato, mostrando que a interação ocorre proporcionalmente, onde a intensidade de corrente de pico catódico aumenta conforme a concentração do 6CN10 do meio. Nota-se exceto pra última concentração avaliada de 6CN10, o comportamento de perda de reversibilidade.

Figura 23 – VC registado em eletrodo de carbono vítreo modificado com gel de quitosana β -CDSH-NanoAu, em solução de tampão fosfato pH 7,03 em diferentes concentrações do 6CN10 (10^{-6} a $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹).



Fonte: Autora, 2017

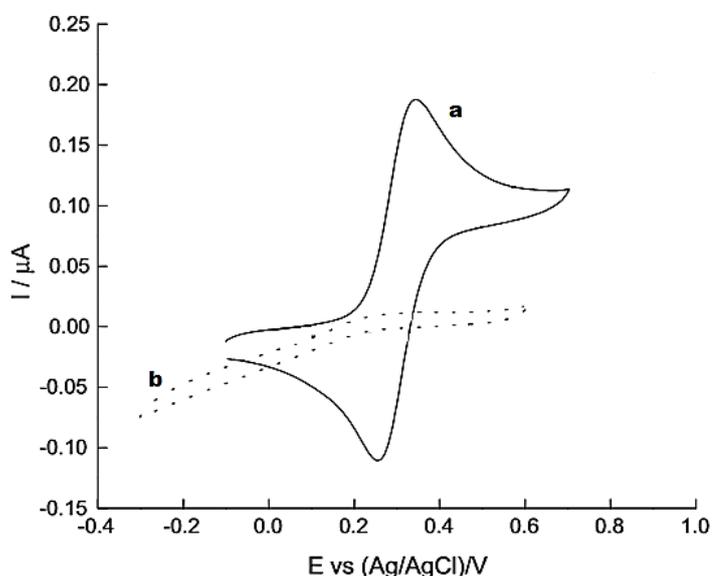
Apesar de preliminar o estudo comprova a possibilidade de associação de nanopartículas a β -CDSH, para obtenção de resultados satisfatórios quando se deseja observar a formação do complexo entre β -CD e o analito em estudo.

4.2.3 Eletrodo de ouro modificado com a formação da SAM de β -CDSH + MUA

Eleamen e colaboradores (2016) em estudo recentemente publicado mostraram a interação, a formação do complexo e o aumento da solubilidade em cerca de 29 vezes do 6CN10 com ciclodextrina do tipo 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina através de técnicas como de análise térmica, infravermelho e microscopia de varredura. Os resultados apresentados até aqui também sugerem essa interação, porém de maneira qualitativa. Para obter resultados em grau quantitativo, utilizou-se uma SAM de β -CDSH, para avaliar o sistema proposto.

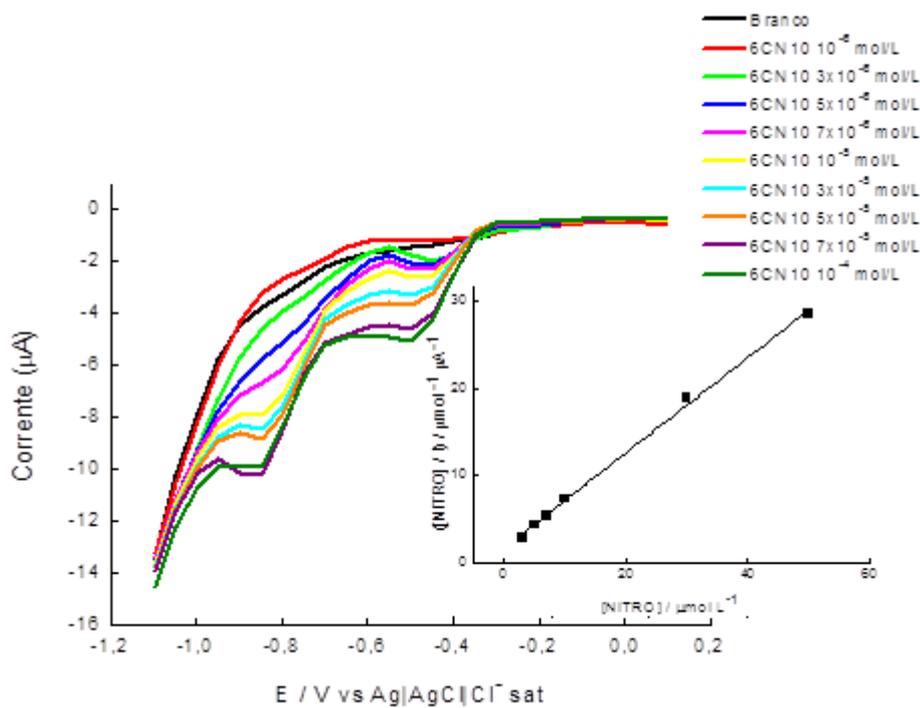
A Figura 24 mostra o voltamograma cíclico de $K_3[Fe(CN)_6]$ e Fc-CO₂H em eletrodo de ouro modificado com camada mista de β -CDSH + MUA em Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹. A molécula de Fc-CO₂H, devido ao seu tamanho, pode entrar na cavidade da β -CD e sofrer transferência de elétrons (BOLLO et al., 2003). Como mostrado na Figura 24, a camada mista não promove a supressão do processo redox do ácido ferrocenocarboxílico; por outro lado, não apresenta nenhum pico referente ao par redox para o ferricianeto de potássio. Esse comportamento é esperado para o ferricianeto, porque seu tamanho é maior do que a cavidade da β -CD e, assim, o acesso da sonda ao eletrodo de ouro é eficazmente bloqueado pela monocamada mista (BOLLO et al., 2003; DAMOS et al., 2007), o que comprovada a formação eficiente da monocamada.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ (a), Fc-CO₂H (b) em eletrodo de ouro modificado com β -CDSH + MUA. Na₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹ como eletrólito suporte a 0,01 V s⁻¹.



Foi possível construir uma curva de calibração para o complexo 6CN10: β -CD em SAM de β -CDSH + MUA utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial para a faixa de concentração de 10^{-6} mol L $^{-1}$ a 10^{-4} mol L $^{-1}$ (Figura 25) pela adição de alíquotas sucessivas de 6CN10 em solução de Na $_2$ SO $_4$ 0,2 mol L $^{-1}$. As varreduras foram realizadas na velocidade de 0,05 V s $^{-1}$ na faixa de 0,2 a -1,0 V.

Figura 25 - VPD registado em solução de Na $_2$ SO $_4$ a 0,2 mol L $^{-1}$ em diferentes concentrações do 6CN10 (10^{-6} mol L $^{-1}$ a 10^{-4} mol L $^{-1}$) em eletrodo de Au modificado com β -CDSH+MUA. Inserção: determinação de constante de equilíbrio entre 6CN10: β -CD.



Fonte: Autora, 2017

Nos voltamogramas de pulso diferencial (Figura 25), observou-se que o aumento da concentração de 6CN10 induz um deslocamento do potencial de pico catódico para valores mais negativos. Tendo a corrente de pico catódico, foi possível determinar a constante de formação (K_F) do 6CN10 na SAM, utilizando uma derivação da isoterma de Langmuir como mostrado na Equação 8:

$$\frac{[6CN10]_0}{I} = \frac{1}{KI_{max}} + \frac{[6CN10]_0}{I_{max}} \quad \text{Eq. 8}$$

onde $[6CN10]_0$ é a concentração da espécie eletroativa, I é a corrente de pico medida para cada concentração da molécula de 6CN10, I_{max} é a corrente de pico máxima, e

K é a constante de formação da molécula de 6CN10 com β -CD ancorada na superfície do eletrodo (MAEDA et al., 1997; DAMOS et al., 2007; FERREIRA et al., 2010).

A constante de formação (K_F) entre 6CN10 e β -CD foi calculada através da inclinação da reta mostrada na inserção do “b” (Figura 25), sendo o coeficiente angular da equação da reta, e “a” valor do termo independente obtido por extrapolação da reta $Y = a + bx$. De posse do valor de b , calcula-se o valor de I_{max} pela equação apresentada e, em seguida, com os valores de a e I_{max} obteve-se um valor de $3,3 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ para a constante de formação, que apresenta uma ordem de grandeza considerada significativa e até 10 vezes maior quando comparada com a outros estudos que usaram essa metodologia com diferentes substâncias ativas (FERREIRA et al., 2010; FUKUDA; MAEDA; KITANO, 1999).

A partir da curva construída foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para 6CN10 em eletrodo de ouro β -CDSH + MUA. Sabe-se que limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, e portanto, com a aplicação da equação 5 o valor obtido foi de $1,83 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad \text{Eq.5}$$

Já o limite de quantificação por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Para a obtenção do LQ aplicou-se a equação 6 resultando no valor de $6,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

$$LQ = \frac{10 S_B}{b} \quad \text{Eq. 6}$$

onde em ambos os casos S_B é o desvio padrão médio e o b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

4.2.4 Determinação espectrofotométrica da constante de formação aparente do complexo β -CD:6N10

A espectroscopia por UV-Vis também foi utilizada para a identificação da formação de complexo de inclusão como o caso que estudamos. Não se trata de uma técnica tão sensível como a voltametria de pulso diferencial, mas seus resultados contribuem para um melhor entendimento de formação do complexo e até mesmo valida os estudos eletroquímicos, quando estes mostram perfil semelhante.

A formação do complexo de inclusão em de 6CN10 com β -CD em meio aquoso-etanolico (5% de etanol) foi realizado mantendo-se fixa a concentração de 6CN10 em 10^{-5} mol L⁻¹ e variando a concentração de β -CD de 5×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L⁻¹. Aplicando a equação de Benesi-Hildebrand (Equação 7) (HERNÁNDEZ-BENITO *et al.*, 1999) foi possível calcular as constantes de dissociação K_D e formação $K_F = 1/K_D$ para o complexo estudado:

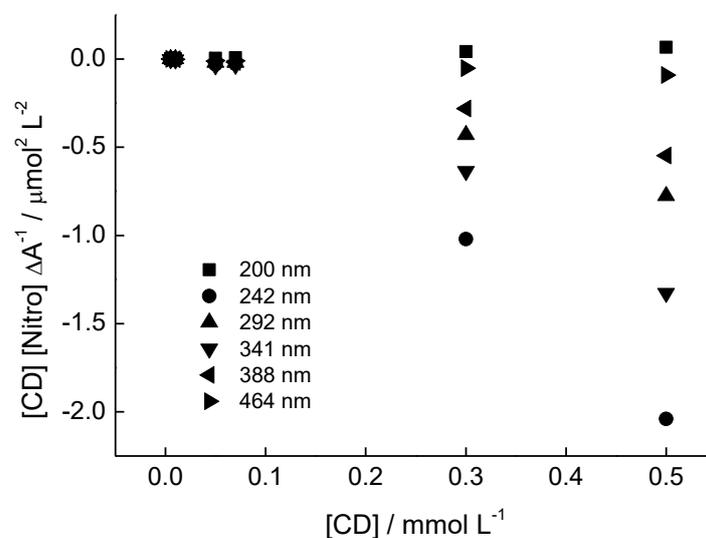
$$\frac{[C][S]_0}{\Delta A} = \frac{K_D}{\Delta \epsilon} + \frac{[C]}{\Delta \epsilon} \quad \text{Eq. 7}$$

em que: [C] refere-se a concentração de β -CD; [S]₀ a concentração inicial do substrato; K_D é a constante de dissociação do complexo; $\Delta \epsilon$ corresponde a variação da absorvitude molar e ΔA é a variação da absorbância.

Traçando o gráfico dos valores de [C] [S]₀ / ΔA versus [C] foi possível encontrar uma linha reta. O quociente entre os valores do intercepto do eixo y e da inclinação fornece o valor de K_D . A Figura 26 mostra os resultados em ajustamentos à equação Benesi-Hildebrand em vários comprimentos de onda entre 200 a 463nm, com um tempo de contato de 2h. O equilíbrio da formação do complexo de 6CN10: β -CD pode ser escrita como a equação 8:



Figura 26 - Determinação da constante de equilíbrio do complexo 6CN10: β -CD de acordo com a equação Benesi - Hildebrand em diferentes comprimentos de onda. [6CN10] = 10^{-5} mol L⁻¹ (5% v / v de EtOH); [β -CD] = $5,0 \times 10^{-6}$ - 5×10^{-4} mol L⁻¹. Tempo de contato de 2h.



Fonte: Autora, 2017.

A constantes de dissociação aparente e a de formação obtidas a partir dessas curvas, encontram-se na Tabela 2. Para os seis comprimentos de onda houve uma variação na ordem de grandeza da constante de 10^4 a 10^5 , tendo como valor médio de $K_F = 7,92 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 2 - As constantes de dissociação e de formação de complexos 6CN10: β -CD após 2 h de contato obtidas a partir da equação Benesi-Hildebrand.

λ/nm	2h		
	$K_D/\text{mol L}^{-1}$	$K_F/\text{L mol}^{-1}$	R
200	$8,43 \times 10^{-6}$	$1,19 \times 10^5$	0,99653
242	$3,72 \times 10^{-5}$	$2,69 \times 10^4$	0,97538
292	3×10^{-5}	$3,34 \times 10^4$	0,98675
341	3×10^{-5}	$3,32 \times 10^4$	0,97918
388	$2,73 \times 10^{-5}$	$3,67 \times 10^4$	0,98545
463	$4,43 \times 10^{-6}$	$2,26 \times 10^5$	0,99922

Fonte: Autora, 2017

Ferreira e colaboradores (2010) estudaram a complexação de mangiferina com β -CD com uma estequiometria de 1:1 e o valor médio encontrado de K_F foi de $1,6 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. Em outro estudo realizado por Alvarez-Parrilla et al. (2005) a complexação de quercetina com β -CD apresentou uma estequiometria de 1:1 e encontraram uma constante de K_F de $1,3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Segundo os estudos realizados por Eleamen e colaboradores o complexo com estequiometria 1:1 entre 6CN10 e ciclodextrina seria mais estável que numa relação 1:2. Logo comparando os dados obtidos com outros estudos a K_F obtida para o complexo 6CN10: β -CD apresentou uma ordem de grandeza intermediária entre os exemplos citados.

As diferenças entre os valores obtidos por espectrofotometria e eletroquímica, apresentam uma variação cerca de 10 vezes maior por eletroquímica (VPD), que pode ser justificada por diferenças nas condições experimentais, por maior sensibilidade da técnica e por algum impedimento espacial relacionado a superfície do eletrodo de ouro (FERREIRA et al., 2010; FUKUDA; MAEDA; KITANO, 1999).

4.3 Estudos de encapsulação com PAMAM 3G

Os dendrímeros surgiram como uma alternativa de agente encapsulante que mostraram resultados bastante promissores (PAEZ et al., 2009; BEGUM et al., 2016).

Os espaços vazios entre suas ramificações e regiões altamente hidrofóbicas, propõe realizar interações do tipo hóspede-hospedeiro assim como as ciclodextrinas e por isso foram também selecionados para avaliar seu poder de solubilização frente ao 6CN10 e de certa forma compará-lo como os resultados até então obtidos para β -CD.

Como já foi elucidado, dentre os dendrímeros disponíveis no mercado o PAMAM é o mais utilizado e conseqüente, já se tem mais estudado quanto a fatores interferentes, toxicidade, associação com nanopartículas, dentre outros (QIAN; YANG, 2006; WANG et al., 2008; MANDAAN et al., 2013; ATZORI et al., 2013; BEGUM et al., 2016). Estudos prévios mostram que o entre as gerações de PAMAM avaliadas (G1 a G4), o de 3ª geração obteve os melhores resultados e por isso foi escolhido para dar continuidade aos experimentos, além do fato de que a partir da 4ª geração o PAMAM já dispõe de uma considerável toxicidade.

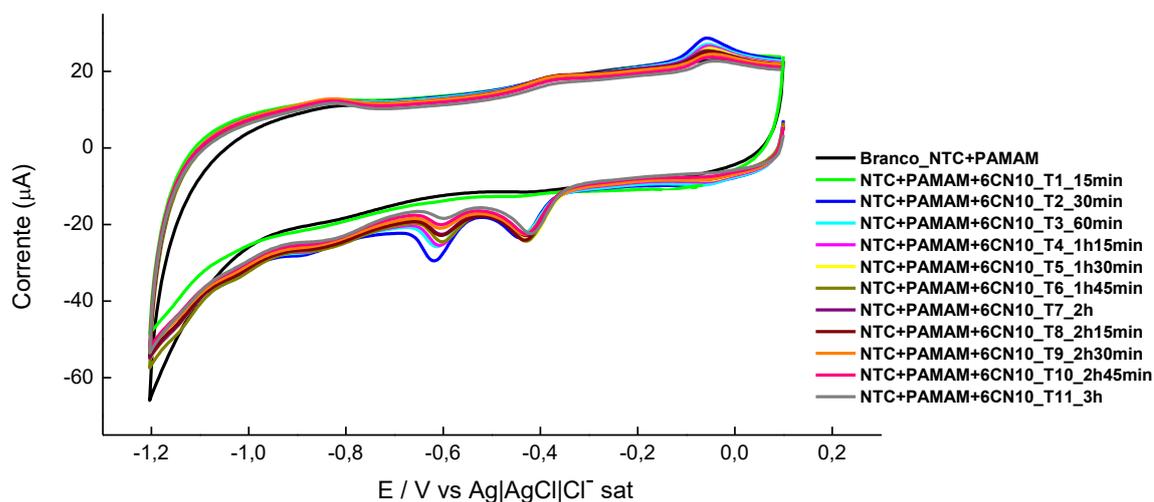
4.3.1 Interação 6CN10:PAMAM 3G em eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC e PAMAM 3G na superfície

Um sensor de NTC foi produzido para realização dos estudos, de modo a servir de suporte para PAMAM 3G na superfície do eletrodo. A literatura já relata a eficiência na associação de NTC e PAMAM (ZENG et al., 2007; ZHU et al., 2009; WU et al., 2016), que se caracteriza por interações de van der Waals entre a superfície do NTC e as terminações amino do PAMAM, acontecendo de maneira ainda mais forte na superfície eletrolítica do carbono vítreo e do ouro (VIJAYARAGHAVAN; STEVESON, 2007). O procedimento utilizado neste trabalho (descrito na metodologia), vem sendo empregado como uma forma de evitar a modificação do PAMAM ou até mesmo o NTC, pois tais modificações poderiam alterar propriedades dos mesmos (VASUMATHI et al 2013; HERRERO et al 2010), o que a princípio não seria interessante para realização das análises. O emprego dessa metodologia permite a produção de uma modificação bastante dispersa e visualmente uniforme na superfície do eletrodo (HERRERO et al, 2010; VIJAYARAGHAVAN; STEVESON, 2007)

Inicialmente foi possível observar a influência do tempo na formação/identificação dessa interação por eletroquímica em eletrodo de carbono vítreo modificado como NTC e PAMAM 3G, em tampão fosfato com 10% de etanol. O 6CN10 foi adicionado a uma concentração de 10^{-5} mol L⁻¹, numa atmosfera de gás

inerte e seu comportamento foi avaliado em intervalos de tempo determinados conforme a figura 27.

Figura 27 - VC do 6CN10 em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vitreo modificado com NTC e PAMAM, em função do tempo.



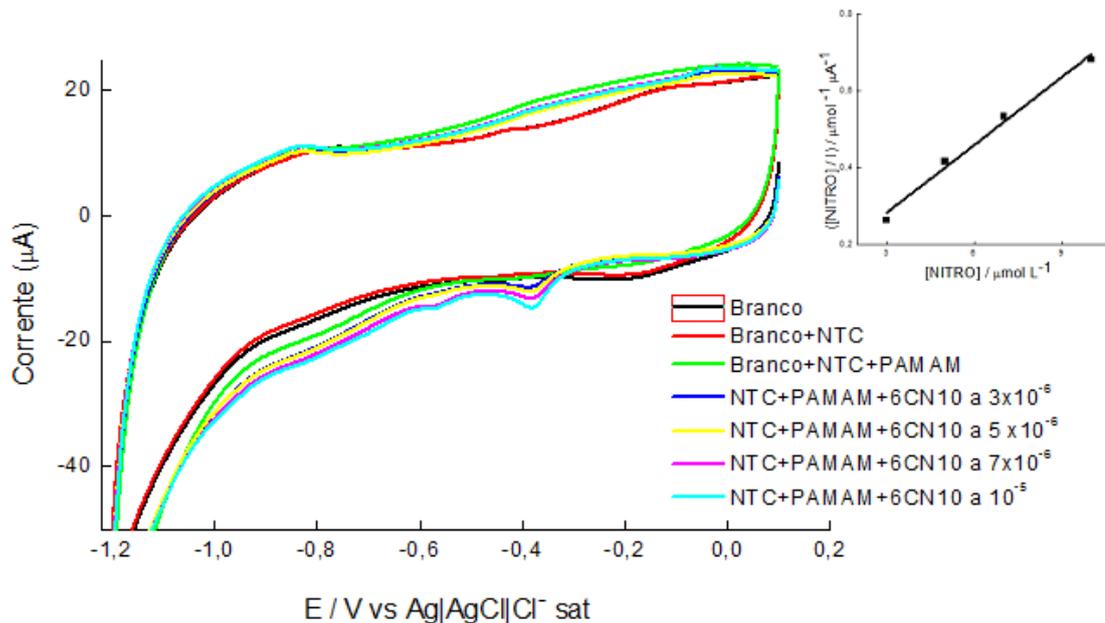
Fonte: Autora, 2017

O VC mostra que foi necessário um tempo de interação mínimo de 30 minutos para que o sinal da redução do nitro pudesse ser claramente visualizado no potencial em torno de 0,4 V, esse passou a ser o tempo padrão utilizado durante os demais procedimentos.

O próximo passo foi determinar a constante de interação entre o PAMAM 3G e o 6CN10, ainda com eletrodo modificado com NTC e PAMAM 3G em sua superfície, alíquotas do nitro foram adicionadas a uma solução aquosa-etanolíco no volume de 10 mL, de modo que sua concentração variou entre 3×10^{-6} a 10^{-5} mol L⁻¹, em um ambiente cercado por gás inerte, tendo o intervalo de 30 minutos entre a adição e análise, ficando sobre agitação constante nesse período anterior a corrida eletroquímica.

Os resultados são mostrados na figura 28 onde é identificado um crescimento da onda de redução do nitro conforme o aumento da concentração do mesmo, além de um leve deslocamento em seu potencial de redução.

Figura 28 - VC do 6CN10 em diferentes concentrações (3×10^{-6} mol L⁻¹ até 10^{-4} mol L⁻¹), em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vitreo modificado com NTC e PAMAM. Inserção: Determinação da constante de equilíbrio da Nitro:PAMAM.



Fonte: Autora, 2017

A partir dos valores de corrente de pico foi possível novamente utilizando uma derivação da isoterma de Langmuir mostrada na equação 8, determinar a constante de formação do complexo (K_F) (MAEDA *et al.*, 1997; DAMOS *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010). Através da inclinação da reta (Figura 28) a constante foi obtida com valor de $5,61 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Uma constante de formação com boa ordem de grandeza, indica uma forte interação e tendência de formação do complexo 6CN10:PAMAM 3G.

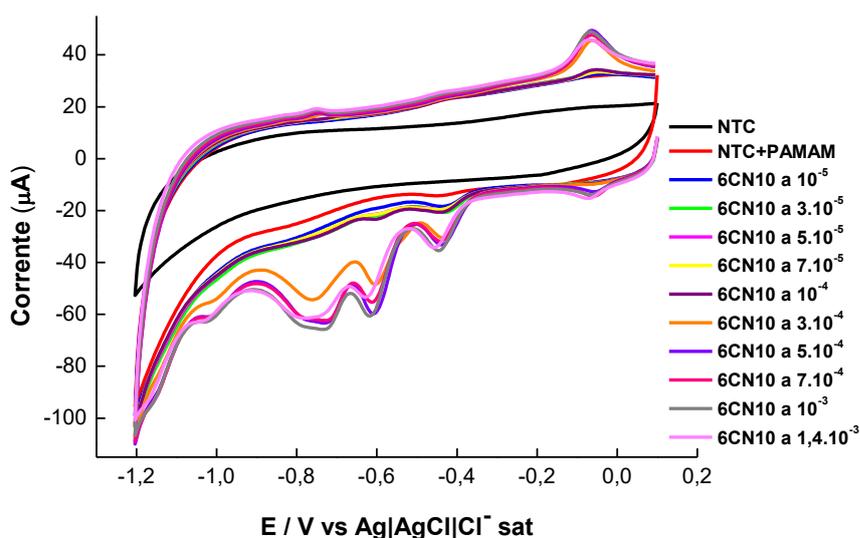
Utilizando essa condição, também, foram determinados os LD e LQ, conforme as equações já descritas (Eq. 5 e Eq. 6), como valores de $1,49 \times 10^{-6}$ e $4,96 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ respectivamente.

Comparando os resultados do eletrodo de Au- β -CDSH-MUA como o de NTC-PAMAM 3G, mesmo que sutil, a diferença entre as constantes mostra uma maior afinidade do 6CN10 pelo PAMAM que pela β -CD, e também é evidenciada pelo menor LD e LQ em presença de PAMAM. Devarakonda e colaboradores (2004) em seu trabalho que avalia a solubilização do fármaco nitroderivado nifedipina com PAMAM os resultados também mostram uma resposta melhor do nitro em presença PAMAM

em comparação a ciclodextrina, quando avaliado em um complexo de estequiometria 1:1.

Ao observar atentamente os voltamogramas anteriores para o PAMAM, constatou-se o aparecimento de novos picos (ou ombros) de redução para o composto, se diferenciando do que normalmente um nitro derivado apresenta em meio prótico e com perfil mostrado em presença de ciclodextrina. Para confirmar tal comportamento novos experimentos foram realizados, agora avaliando o comportamento do 6CN10 com concentrações entre 10^{-5} a $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, os resultados podem ser visto na figura 29.

Figura 29 - VC do 6CN10 em diferentes concentrações (10^{-5} mol L⁻¹ até $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), em meio aquoso Tampão Fosfato pH 7,03, em eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC e PAMAM.



Fonte: Autora, 2017.

Como já mencionado o processo de redução do grupo nitro até a geração da hidroxilamina correspondente, envolve 4 prótons e 4 elétrons, é uma reação relativamente rápida mas com outros intermediários envolvidos (Figura 30), a hipótese para o comportamento apresentado pelo 6CN10 em presença de PAMAM, é que esses intermediários possam estar sendo estabilizados através de ligações com as regiões do PAMAM e por isso sejam passíveis de identificação por eletroquímica. O poder de estabilização de moléculas pelo PAMAM já foi descrito na literatura (BEGUM et al., 2016), tornando plausível tal situação, como modo confirmatório, realizou-se a eletrólise do 6CN10 em presença e ausência de PAMAM conforme descrito na

metodologia. Os produtos eletrogerados foram extraídos e submetidos a análise cromatográfica gasosa acoplada a espectroscopia de massa, na Central Analítica da UFPE, gerando os cromatogramas representados na figura 31.

Figura 30 - Reações envolvidas na redução de um derivado nitro.

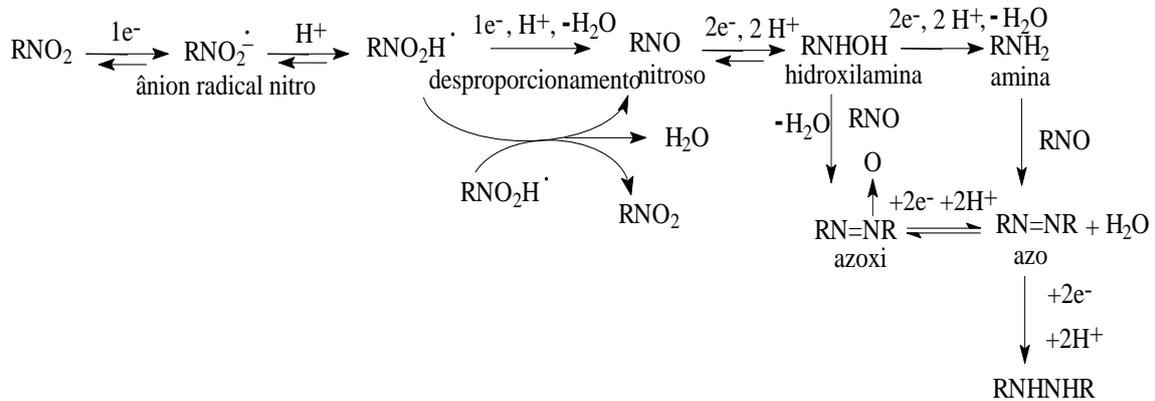
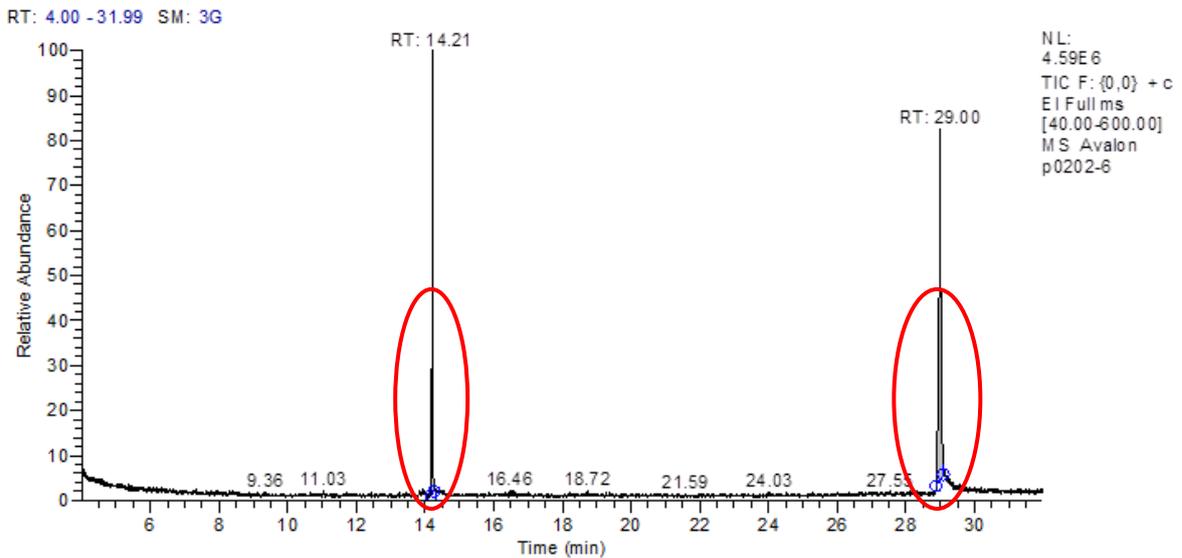
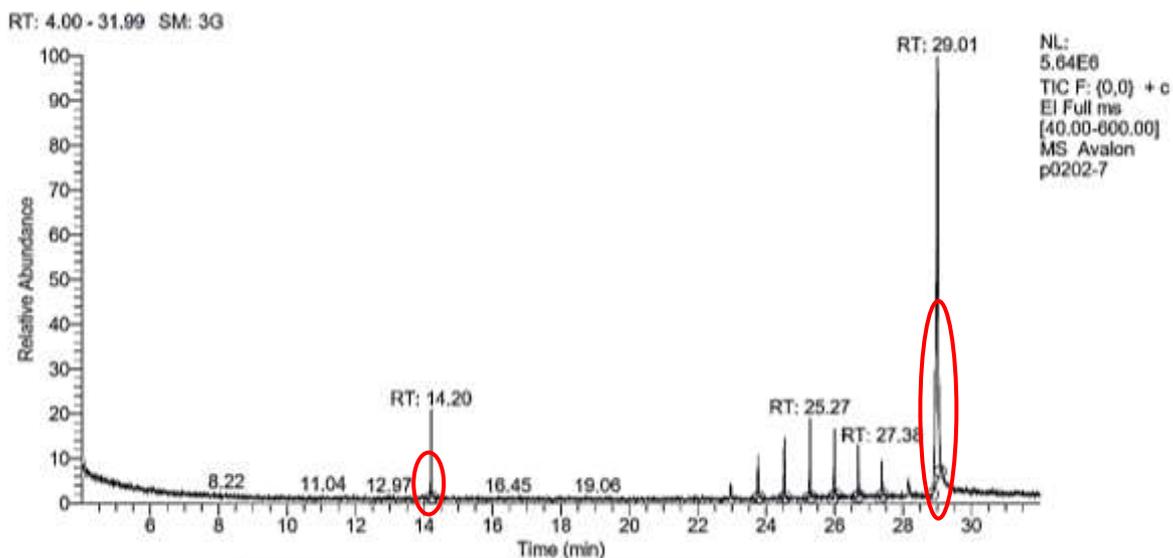


Figura 31 – Cromatogramas gasoso dos produtos eletrogerados da redução do 6CN10 (a) e do 6CN10 em associação com PAMAM 3G (b).

a)



b)



Avaliando os espectros de massa, que encontram-se em Anexo, para os dois picos identificados no cromatograma “a” e os oito do cromatograma “b”, verificamos inicialmente que ambos apresentam dois picos bastante semelhantes com os tempos de retenção aproximados de 14 e 29 min. Onde esse primeiro provavelmente é de um derivado do 6CN10 produzido após sua eletrolise e o segundo (em ± 29 min) refere-se ao próprio 6CN10. Os demais picos do cromatograma “b” representam fragmentos do PAMAM 3G.

Observando ambos os cromatogramas, nota-se que em presença de PAMAM a redução do 6CN10 é dificultada, isto pela grande diferença na proporção dos picos referentes ao produto de redução e do próprio 6CN10 nos cromatogramas, o que indica a estabilização do 6CN10 pelo PAMAM. O que corrobora com os dados dos voltamogramas cíclicos da figura 29, na página 61, uma vez mais estável a redução do nitro passa a ser mais dificultada e ocorrer em potenciais mais negativos. Como PAMAM pode interagir com o 6CN10 de diferentes maneiras e em diferentes locais (como será mostrado no ponto 4.3.3), os picos observados em potencial mais negativos ($\pm -0,8V$ e $\pm -0,6V$) seriam referentes a diferentes complexos formados entre o 6CN10 e PAMAM 3G, onde o primeiro pico em $\pm 0,4V$ representa a redução do 6CN10 que não interagiu com PAMAM 3G. Logo o comportamento estabilizador do PAMAM ocorre sobre a própria molécula 6CN10 e não sobre os seus produtos de redução como foi sugerido anteriormente.

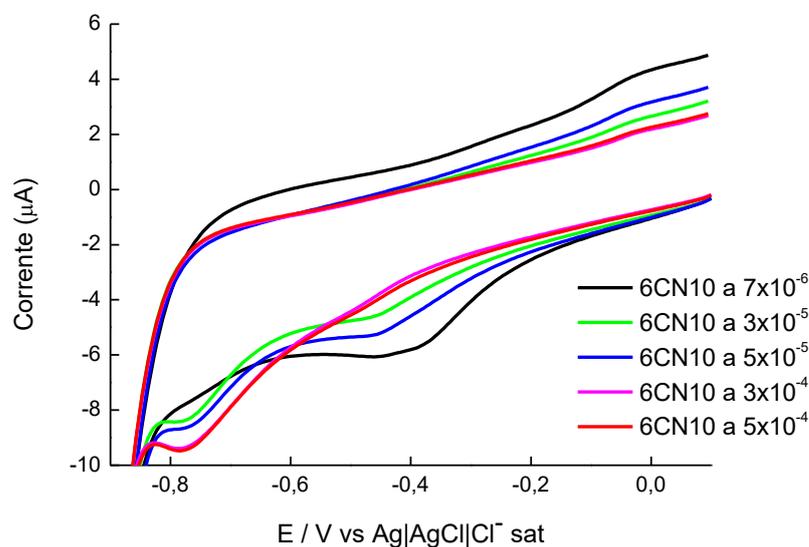
4.3.2 Interação 6CN10:PAMAM em eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM 3G

Dentro da perspectiva adotada pelo método de Benesi–Hildebrand (e derivação), a formação de um complexo é avaliada numa relação 1:1 ou 1:2 (YANG et al., 2000; WANG; YU, 2007; KADAR et al, 2005; FERREIRA et al., 2010), mas como observamos nos dados da Tabela 1, o PAMAM 3G tem só em sua extremidade, 32 grupos aminos disponíveis; pressupõe-se então que a estequiometria de formação do complexo com o PAMAM envolve mais de uma molécula do composto associada a ele para cada mol do PAMAM, surgiu então a necessidade de buscar uma metodologia alternativa que levasse em consideração todos esses pontos, para assim determinar uma constante de formação do complexo mais próxima das características do PAMAM.

Bustos e colaboradores (2008), em seu trabalho acoplou na superfície do eletrodo de ouro o PAMAM, por intermédio da molécula de MUA que fez a ligação entre a superfície do ouro e o PAMAM, garantindo sua imobilização, com maiores possibilidades de sítio ativos disponíveis, visto que boa parte de suas amins terminais ficam livres, acreditando-se que dessa forma teríamos uma melhor proximidade com a realidade, a metodologia foi então empregada.

O eletrodo Au/MUA/PAMAM 3G foi avaliado em meio aquoso-etanólico (10% de etanol), como diferentes concentrações de 6CN10 (7×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L⁻¹), buscando determinar o número de sítios ativos no PAMAM 3G e a constante de equilíbrio entre 6CN10 e o referido dendrímeros (Figura 32).

Figura 32 - Voltamograma cíclico para o 6CN10 em diferentes concentrações (7×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L⁻¹) com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G3. Tampão Fosfato pH 7,03, 10% de etanol v/v, $v = 0,05$ V s⁻¹.

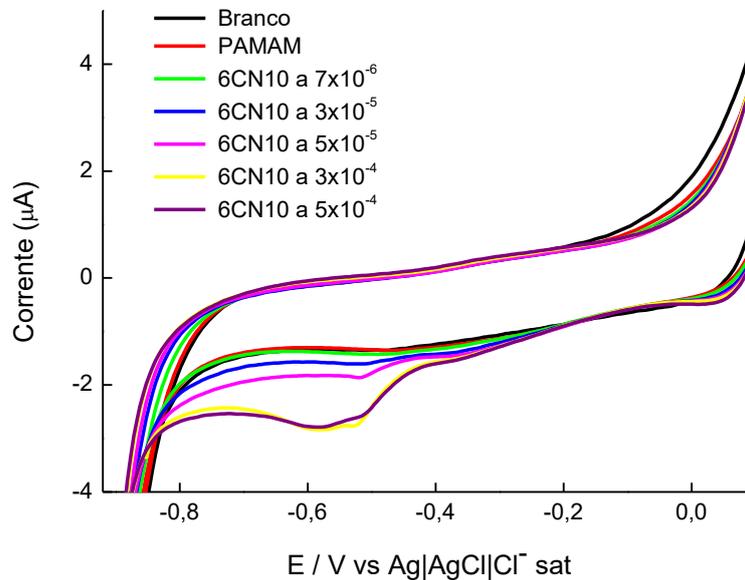


Fonte: Autora, 2017

A mudança na metodologia, leva a interpretação do VC de maneira que o perfil apresentado seria da substância livre e complexada, como mostram outros estudos (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011), sendo o pico referente a substância livre localizado em torno de -0,4 V e da mesma complexada em cerca de -0,78 V, observa-se também que em determinado momento o pico a substância livre desaparece, indicando a total complexação das moléculas de 6CN10 disponíveis pelo PAMAM 3G.

Quando o experimento foi repetido nas mesmas condições exceto pela modificação do eletrodo de Au que não foi realizada e o PAMAM que foi adicionado à solução (Figura 33), observou-se que o sinal eletroquímico do 6CN10 só foi verificado a partir da concentração 3×10^{-5} mol L⁻¹ e que não houve uma separação dos dois picos como observado na figura 32, evidenciando uma maior sensibilidade do sensor empregado na figura 32 e a necessidade de utiliza-lo para obtenção de dados mais confiáveis para o cálculo da constante.

Figura 33 - Voltamograma cíclico para o 6CN10 em diferentes concentrações (7×10^{-6} a 5×10^{-4} mol L⁻¹) com eletrodo de ouro e PAMAM G3 em solução. Tampão Fosfato pH 7,03, 10% de etanol, $v = 0,05$ V s⁻¹.



A vinculação do número de moléculas de ligantes associadas por 1 mol de receptor e a concentração da substância adicionada no meio apresenta um caráter hiperbólico (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011):

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{kn[6CN10]}{1 + K[6CN10]} \quad \text{Eq. 9}$$

sendo ΔI , é a diferença entre os valores de corrente ($I_P - I_M$) gerada pela redução do 6CN10 em diferentes concentrações, (I_P) a corrente referente a substância complexada e (I_M) a corrente referente a substância livre, n é o número de sítios ativos em que a droga pode se ligar no dendrímero, K a constante de equilíbrio do complexo formado e $[6CN10]$, a concentração do 6CN10.

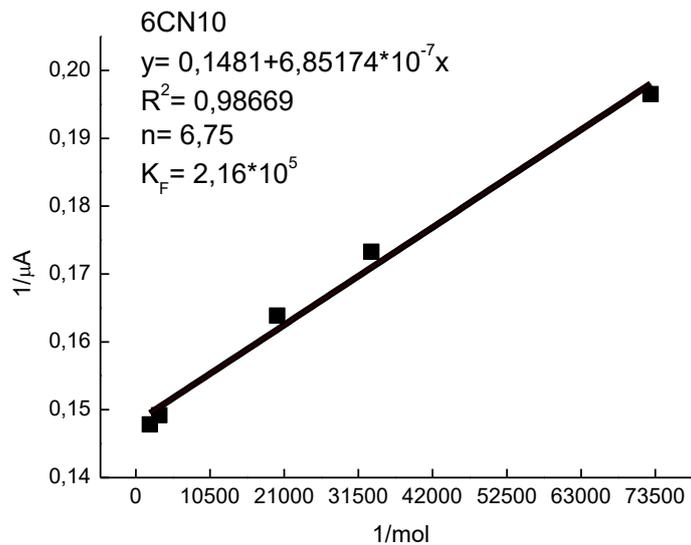
Para melhor analisar os resultados é necessário linearizar a equação anterior, que resulta num sistema duplamente inversamente proporcional descrita como equação de Scatchard-Klotz (BOBROVNIK, 2002; BUCZKOWSKI et al, 2011; SCATCHARD, 1949):

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{K[6CN10]} + \frac{1}{n} \quad \text{Eq. 10}$$

Os dados experimentais levaram a obtenção da reta mostrada na figura 34, como sua respectiva equação da reta e valor de R^2 , além do número de sítio ativos n para

o PAMAM 3G na condição apresentada e da constante de equilíbrio do complexo formado 6CN10:PAMAM 3G

Figura 34 - Curva analítica gerada através dos valores de concentração e corrente da 6CN10 com eletrodo de ouro modificado com MUA e PAMAM G3. Tampão Fosfato pH 7,03, 5% de etanol, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



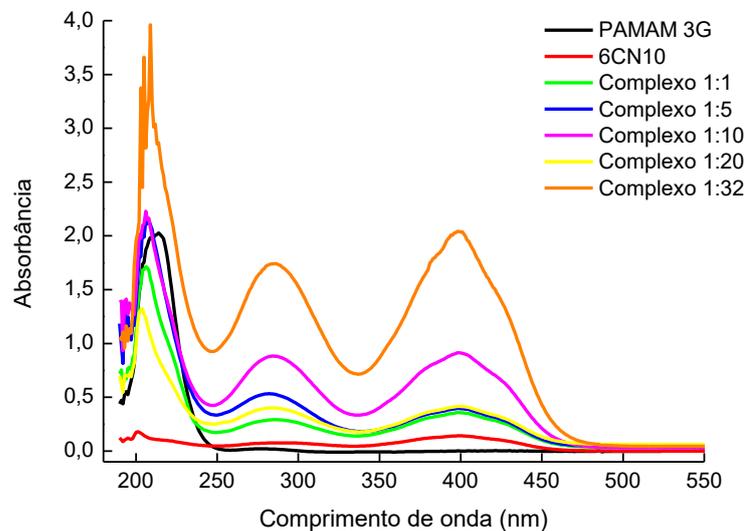
Fonte: Autora, 2017.

Dentre as três constantes apresentadas esta última apresenta um menor valor, tal comportamento pode ser associado ao baixo número de sítios ativos, obtidos por essa metodologia, disponíveis para complexação, contudo tal resultado não descarta a possibilidade do uso do PAMAM 3G como agente encapsulante, pois todas as constantes encontram dentro da ordem de grandeza de 10^5 valor que indica uma forte intenção a formação do complexo.

4.3.3 Estudos espectroscópicos de formação do complexo de 6CN10:PAMAM 3G

Assim como para ciclodextrina os métodos espectroscópicos já foram relatados como uma forma de comprovar a formação do complexo entre um fármaco e o dendrímero, possibilitando a caracterização desse complexo, determinado o número de moléculas incorporadas ao dendrímero em solução metanólica (DEVARAKONDA et al 2007; KLEINMAN et al., 2000; KOLHE et al., 2003; MUSTAFA, 2015).

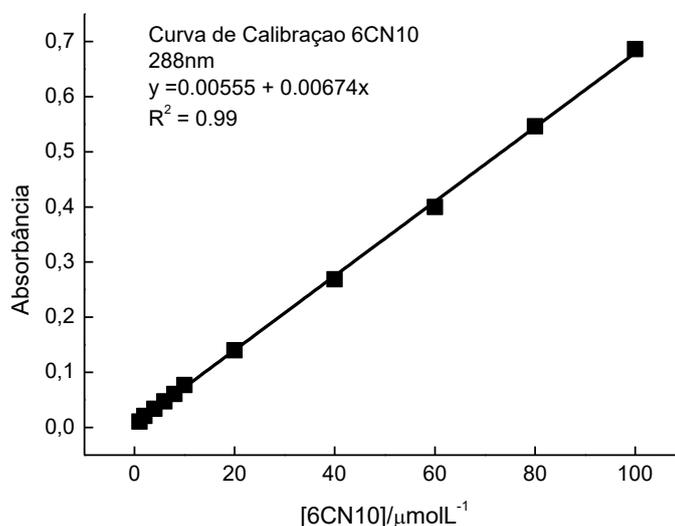
Figura 35 - Estudo espectroscópico, para caracterização do complexo entre o 6CN10 em diferentes concentrações (1×10^{-6} mol L⁻¹ a 4×10^{-5} mol L⁻¹) com PAMAM 3G (10^{-5} mol L⁻¹).



Fonte: Autora, 2017

Tomando como base a curva de calibração do 6CN10 em metanol (Figura 36) no comprimento de onda 288 nm, que gerou uma reta com valor de R² de 0,99 e coeficiente angular de 0,00555 e linear de 0,00674, calculou-se o número de moléculas incorporadas em cada mol de PAMAM 3G para os complexos estabelecidos, visto na Tabela 3: O cálculo foi feito como mencionado, a partir da equação da reta da curva de calibração, com “y” é o valor da absorbância e “x” a concentração da substância, então aplica-se os valores da absorbância pra cada complexo formado para obtenção das respectivas concentrações da substância, esses valores são então multiplicados pelo volume (5 mL) e como resultado encontra-se o número de mols de 6CN10 no complexo, que em seguida foi dividido pelo número de mols de dendrímero PAMAM 3G, para assim determinar o número de moléculas incorporadas.

Figura 36 - Curva de calibração do 6CN10 em diferentes concentrações (1×10^{-6} mol L⁻¹ até 1×10^{-4} mol L⁻¹), em metanol, versus as absorbâncias 288nm.



Fonte: Autora, 2017

Tabela 3 - Números de moléculas incorporadas, para cada complexo analisado.

Complexo	Moléculas incorporadas
1:1	4,39
1:5	7,78
1:10	13,08
1:32	39,35

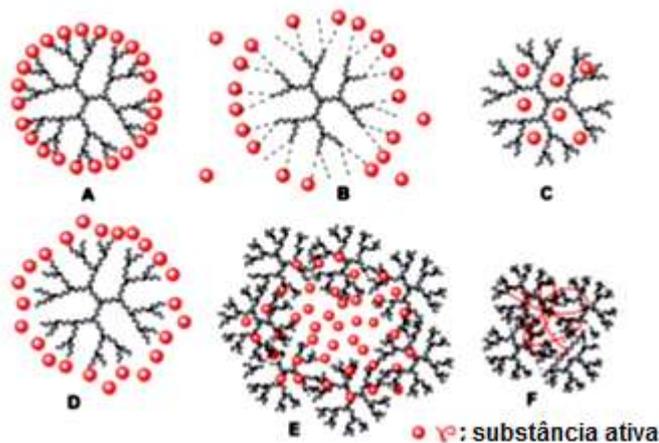
Fonte: Autora, 2017

Ao analisar os dados da tabela 3, nota-se que uma quantidade maior de moléculas foi incorporada em relação ao número esperado, tal resultado leva a suposição que o 6CN10 se liga ao PAMAM por diferentes maneiras, hipótese também levantada em análises com nifedipina por Devarakonda e colaboradores (2004).

Cinco tipos diferentes de interações entre dendrímeros e fármaco podem ser previstas, como mostrado na Figura 37. Várias moléculas do composto estudado podem se ligar como as funções terminais do dendrímeros, através de ligações covalente (Figura 37A) ou uma ligação clivável (Figura 37B). O fármaco pode interagir de forma não covalente com a estrutura interna altamente hidrofóbica do dendrímero (Figura 37C), ou com a parte externa (Figura 37D). Além desses casos que levam em

consideração a estrutura e tamanho do dendrímero e do composto, esta interação pode ocorrer entre associação de dendrímeros (Figura 37E e 37F) (ESFAND; TOMALIA, 2001; SATIJA; SAI; MUKHERJI, 2011; MANDAAN et al., 2013; CAMINADE; TURRIN, 2014; POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014; MOHAMMADIFAR ; KHARAT; ADELI, 2015). Como a substância avaliada apresenta um perfil hidrofóbico, parte dela pode estar interagindo com os espaços vazios no interior do dendrímeros por ligações hidrofóbicas, o que em outros casos mostrou o aumento da solubilidade e diminuição da toxicidade do fármaco (POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014), além de ligar-se também as aminas terminas do mesmo, sendo possível já que os dendrímeros podem interagir com diferentes moléculas ao mesmo tempo em seus diversos sítios ativos (MANDAAN et al., 2013; CAMINADE; TURRIN, 2014).

Figura 37 - Tipos de ligações possíveis com dendrímeros (Representado em um dendrímero de 3ª geração).



Fonte: Adaptado de CAMINADE; TURRIN, 2014

4.4 Avaliação geral das diferentes modificações empregados no estudo do 6CN10

A tabela 4 traz um compilado de informações para as 4 diferentes modificações de eletrodo apresentadas nesse trabalho.

Tabela 4 - Dados referente aos estudos com eletrodo de carbono vítreo e ouro modificados.

Eletrodo	K_F (M⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	LQ (mol L⁻¹)
CV + Gel de quitosana + β-CDSH-NanoAu	-----	4,4x10 ⁻⁶	1,47x10 ⁻⁵
Au + SAM de β-CDSH	3,3x10 ⁵	1,83x10 ⁻⁶	6,1x10 ⁻⁶
CV + NTC + PAMAM 3G	5,61x10 ⁵	1,49x10 ⁻⁶	4,96x10 ⁻⁶
Au + SAM de MUA + PAMAM 3G	2,16x10 ⁵	3,07x10 ⁻⁶	1,02x10 ⁻⁵

Fonte: Autora, 2017

Observando a tabela 4 vemos que os melhores valores de constante de formação, limite de detecção e quantificação estão relacionados ao agente encapsulante PAMAM 3G, de modo especial quando este está imobilizado sobre um sensor de NTC, dando a ele uma sutil vantagem quando comparado com a β-CD na formação do complexo com 6CN10. Já os resultados de PAMAM na formação da SAM com MUA em eletrodo de ouro, mesmo com o valor mais baixo entre as constantes determinadas, é extremamente significativo, pois tal valor pode estar associado ao número de sítios ativos disponíveis indicados pela metodologia, uma vez que na formação dos complexos para uma futura aplicação farmacêutica, todos os sítios ativos estarão disponíveis, seu perfil de interação será ainda melhor.

Os resultados com β-CD também são bastante importantes, pois indica a viabilidade de uma futura aplicação, tendo em vista que esse agente diferente do PAMAM já é encontrado em algumas formulações comerciais como por exemplo o Maxsulid®.

De modo geral, os agentes encapsulantes β-CD e PAMAM 3G foram eficientes no estudo do nitrocomposto 6CN10 com valores significativos de K_F, LD e LQ.

5 CONCLUSÃO

A substância estudada neste trabalho (2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila) apresentou comportamento eletroquímico típico de nitrocompostos aromáticos em meio prótico, sendo este resultado observado através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica.

O estudo da interação do 6CN10 com β -ciclodextrina mostrou-se bem significativo. Inicialmente verificou-se o aumento da corrente de pico catódico em função da concentração de ciclodextrina, com o auxílio de uma SAM construída em eletrodo de Au como β -CDSH, que junto aos dados espectroscópicos, e respectivas K_F , comprovam a interação do 6CN10 com a β -CD.

O processo de interação da β -CD com 6CN10 também foi verificado no sistema onde a β -CD encontrava-se associada ao nanoAu.

O PAMAM 3G reproduziu resultados ainda mais promissores com duas K_F determinadas, uma através de um sensor de NTC+PAMAM 3G em eletrodo de carbono vítreo e outra em superfície de ouro com uma SAM de MUA+PAMAM 3G. Comparando com os resultados em eletrodo de Au- β -CDSH, o sensor de NTC+PAMAM apresentou também menor LD e LQ. O perfil favorável também foi verificado nos resultados espectroscópicos, que indicam a possibilidade do 6CN10 interagir com o PAMAM por diferentes tipos de ligação (Van der Waals, hidrofóbicas, dentre outras).

Em presença de PAMAM, verificou-se que a redução de 6CN10 apresentou sinais eletroquímicos atípicos, ao avaliar os produtos eletrogerados pela eletrólise do 6CN10 com e sem PAMAM 3G por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, observou-se que o PAMAM 3G estabiliza o 6CN10, dificultando sua redução, por sua vez os sinais eletroquímicos vistos no voltamograma são referentes a diferentes formas de complexos do 6CN10 com PAMAM 3G.

Ambos os agentes encapsulantes foram eficientes para a obtenção do complexo e podem ser utilizados para o desenvolvimento de diferentes formulações farmacêuticas, contudo é notório uma pequena vantagem do complexo 6CN10 com PAMAM frente ao uso da β -ciclodextrina.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar uma nova eletrólise do 6CN10, extrair os produtos eletrogerados, e separa-los em uma coluna cromatográfica, a fim de identificar de forma mais direta qual derivado de redução do 6CN10 identificado no tempo de retenção de ± 14 min nos cromatogramas da figura 31.

Estudar o comportamento *in vitro* e *in vivo* dos complexos trabalhos.

Aprofundar os estudos de associar desses complexos a nanopartículas de ouro.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. C. D.; FERRAZ, P. A. D. L.; GOULART, M. O. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 19-35, 2002. ISSN 0103-5053.
- ABRUÑA, H. D. Peer Reviewed: Redox and Photoactive Dendrimers in Solution and on Surfaces. **Analytical chemistry**, v. 76, n. 17, p. 310 A-319 A, 2004. ISSN 0003-2700.
- AJAYAN, P. Nanotubes from carbon. **Chemical reviews**, v. 99, n. 7, p. 1787, 1999. ISSN 1520-6890.
- ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 53, n. 1-2, p. 121-129, 2005. ISSN 0923-0750.
- ANDRADE, M. N. S. da C. **Desenvolvimento de um biossensor para ácido láctico a base de nanomateriais eletródicos**. 2013. 70 f. Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013
- ARYA, S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810-2817, 2009. ISSN 0956-5663.
- ATZORI, S. **Synthesis of Novel Calix [4] arene Based Dendrimers and their Biological Applications**. 2013. University of East Anglia
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Poly (amidoamine)(PAMAM): An emerging material for electrochemical bio (sensing) applications. **Talanta**, v. 148, p. 427-438, 2016. ISSN 0039-9140.
- BEGUM, R. et al. Physical chemistry of catalytic reduction of nitroarenes using various nanocatalytic systems: past, present, and future. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 8, p. 231, 2016. ISSN 1388-0764.
- BOBROVNIK, S. Ligand–receptor interaction. Klotz–Hunston problem for two classes of binding sites and its solution. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2002. ISSN 0165-022X.
- BOELSTERLI, U. A. et al. Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 7, p. 715-727, 2006. ISSN 1389-2002.
- BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Almedina Coimbra, 1996.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers.

Advanced drug delivery reviews, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007. ISSN 0169-409X.

BUCZKOWSKI, A. et al. Interaction between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution. **International journal of pharmaceutics**, v. 408, n. 1, p. 266-270, 2011. ISSN 0378-5173.

BUSTOS, E. et al. Electrochemical study of β -Cyclodextrin binding with ferrocene tethered onto a gold surface via PAMAM dendrimers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1010-1016, 2008. ISSN 0103-5053.

CAMINADE, A.-M.; TURRIN, C.-O. Dendrimers for drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 26, p. 4055-4066, 2014.

CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotóis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica.** Universidade de São Paulo

CAVALCANTI, J. et al. Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-Helicobacter pylori metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. **Bioelectrochemistry**, v. 63, n. 1, p. 353-357, 2004. ISSN 1567-5394.

CEREDA, M. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas.** Fundação Cargill, 2003.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **Aaps Pharmscitech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005. ISSN 1530-9932.

CHMURSKI, K.; TEMERIUZ, A.; BILEWICZ, R. Measurement of ibuprofen binding to mixed monolayers containing β -cyclodextrin active sites. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 49, n. 1-2, p. 187-191, 2004. ISSN 0923-0750.

CHOI, S.-W. et al. Characterization of self assembled thiolated β -cyclodextrin and tolane thioacetate mixed monolayer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 257, p. 31-36, 2005. ISSN 0927-7757.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009. ISSN 2179-443X.

DAMOS, F. S. et al. Adsorption kinetic and properties of self-assembled monolayer based on mono (6-deoxy-6-mercapto)- β -cyclodextrin molecules. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, n. 1, p. 181-193, 2007. ISSN 1572-6657.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011. ISSN 0079-6700.

DENG, P. et al. Electrocatalytic reduction and determination of p-nitrophenol on acetylene black paste electrode coated with salicylaldehyde-modified chitosan.

Sensors and Actuators B: Chemical, v. 168, p. 381-389, 2012. ISSN 0925-4005.

DEVARAKONDA, B.; HILL, R. A.; DE VILLIERS, M. M. The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. **International journal of pharmaceutics**, v. 284, n. 1, p. 133-140, 2004. ISSN 0378-5173.

DEVARAKONDA, B. et al. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. **International journal of pharmaceutics**, v. 345, n. 1, p. 142-153, 2007. ISSN 0378-5173.

ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coordination chemistry reviews**, v. 254, n. 15, p. 1769-1802, 2010. ISSN 0010-8545.

ELEAMEN, G. R. et al. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Aminothiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **insulin**, v. 10, p. 11,

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. **Nanocarrier systems for transdermal drug delivery**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535108107.

ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug discovery today**, v. 6, n. 8, p. 427-436, 2001. ISSN 1359-6446.

FERANCOVÁ, A.; LABUDA, J. Cyclodextrins as electrode modifiers. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 370, n. 1, p. 1-10, 2001. ISSN 0937-0633.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1, p. 14-23, 2007. ISSN 0027-5107.

FERREIRA, F. R. et al. Electrochemical investigations into host–guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 797-803, 2010. ISSN 0013-4686.

FERREIRA, O. Nanotubos de Carbono: Preparação e Caracterização. 2003. 38f. **Monografia (Apresentada como Exame de Qualificação de Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.**

FLETCHER, D.; GREEF, R.; REAT, R. **Instrumental methods in electrochemistry**: Horwood Publishing Ltd, Coll House, Westergate, Chichester, England 2001.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003. ISSN 0100-4042.

FUKUDA, T.; MAEDA, Y.; KITANO, H. Stereoselective inclusion of DOPA derivatives by a self-assembled monolayer of thiolated cyclodextrin on a gold electrode.

Langmuir, v. 15, n. 5, p. 1887-1890, 1999. ISSN 0743-7463.

HERNÁNDEZ-BENITO, J. et al. A Practical Integrated Approach to Supramolecular Chemistry. I. Equilibria in Inclusion Phenomena. **J. Chem. Educ.**, v. 76, n. 3, p. 419, 1999.

HERRERO, M. A. et al. Gold dendrimer encapsulated nanoparticles as labeling agents for multiwalled carbon nanotubes. **ACS nano**, v. 4, n. 2, p. 905-912, 2010. ISSN 1936-0851.

HORROCKS, S. M. et al. Effects of Short-Chain Nitrocompounds against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in vitro. **Journal of food science**, v. 72, n. 2, p. M50-M55, 2007. ISSN 1750-3841.

HROMADOVÁ, M. et al. New electrochemical oscillator based on the cation-catalyzed reduction of nitroaromatic radical anions. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 22, p. 4991-4996, 2009. ISSN 0013-4686.

JIANG, Q. et al. Preparation and characterization on the carbon nanotube chemically modified electrode grown in situ. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 3, p. 424-427, 2008. ISSN 1388-2481.

JICSINSZKY, L.; IVÁNYI, R. Catalytic transfer hydrogenation of sugar derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 45, n. 2, p. 139-145, 2001. ISSN 0144-8617.

JULIÃO, M. S. D. S. et al. Voltammetric detection of the interactions between RNO 2- and electron acceptors in aqueous medium at highly boron doped diamond electrode (HBDDE). **Electrochimica acta**, v. 51, n. 24, p. 5080-5086, 2006. ISSN 0013-4686.

KALBASI, R. J.; ZAMANI, F. Synthesis and characterization of Ni nanoparticles incorporated into hyperbranched polyamidoamine-polyvinylamine/SBA-15 catalyst for simple reduction of nitro aromatic compounds. **RSC Advances**, v. 4, n. 15, p. 7444-7453, 2014.

KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A. **Farmacologia Básica e Clínica, 10ª edição**: São Paulo: McGraw-Hill Editores, SA Klaumann, PR, Wouk, AFPF e Sillas 2007.

KIM, D. et al. Formation and reduction of aryl and heterocyclic nitroso compounds and significance in the flux of hydroxylamines. **Chemical research in toxicology**, v. 17, n. 4, p. 529-536, 2004. ISSN 0893-228X.

KLEINMAN, M. H. et al. Effect of protonation and PAMAM dendrimer size on the complexation and dynamic mobility of 2-naphthol. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 48, p. 11472-11479, 2000. ISSN 1520-6106.

KOLHE, P. et al. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, n. 1, p. 143-160, 2003. ISSN 0378-5173.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Guanabara, 1988.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. D. A. C. **Dicionário terapêutico guanabara**. Guanabara Koogan, 2007. ISBN 8527706784.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 810-824, 2014. ISSN 1099-1263.

KÁDÁR, M. et al. Spectrophotometric determination of the dissociation constants of crown ethers with grafted acridone unit in methanol based on Benesi-Hildebrand evaluation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 62, n. 4, p. 1032-1038, 2005. ISSN 1386-1425.

LIU, B. et al. Adsorption properties of Cd (II)-imprinted chitosan resin. **Journal of materials science**, v. 46, n. 5, p. 1535-1541, 2011. ISSN 0022-2461.

LIU, J. et al. Electrochemical sensor for o-nitrophenol based on β -cyclodextrin functionalized graphene nanosheets. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 11, 2013. ISSN 1687-4110.

LIU, K. et al. Assembly of β -cyclodextrins acting as molecular bricks onto multiwall carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 4, p. 951-957, 2008. ISSN 1932-7447.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1, p. 15-30, 2001. ISSN 0378-5173.

MADAAN, K. et al. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 6, n. 3, p. 139, 2014.

MAEDA, Y. et al. Regio- and stereoselective complexation by a self-assembled monolayer of thiolated cyclodextrin on a gold electrode. **Langmuir**, v. 13, n. 16, p. 4187-4189, 1997. ISSN 0743-7463.

MELINDA-EMESE, F.; DIUDEA, M. V.; GABRIEL, K. CATALYTIC REDUCTION OF 4-NITROPHENOL USING NEW Cu (0)/AROMATIC CORE DENDRIMER COMPLEXES. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia**, v. 61, n. 1, 2016. ISSN 1224-7154.

MELLO, A. M. S. **Estudo eletroquímico da Trifluralina, adsorção em quitosana, interação com o biossensor de dsDNA e toxicidade frente ao caramujo Biomphalaria glabatra**, 2007. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, 2007.

MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. et al. Synthesis and evaluation of the antifungal

activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 30, n. 8, p. 1492-9, 2011.

MOHAMMADIFAR, E.; KHARAT, A. N.; ADELI, M. Polyamidoamine and polyglycerol; their linear, dendritic and linear–dendritic architectures as anticancer drug delivery systems. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 19, p. 3896-3921, 2015.

MONTHIOUX, M.; KUZNETSOV, V. L. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? **Carbon**, v. 44, n. 9, p. 1621-1623, 2006. ISSN 0008-6223.

MOREL, A.-L. et al. Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 304-312, 2010. ISSN 0927-7765.

MOSCOSO, R. et al. A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media: Modification with nitroso/hydroxylamine groups. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 2, p. 217-220, 2011. ISSN 1388-2481.

MOURA, M. A. B. F. Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da Nor- β -lapachona: contribuição da farmacoeletoquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos. 2008.

MUSTAFA, R. et al. Dendrimer-Functionalized Laponite Nanodisks as a Platform for Anticancer Drug Delivery. **Nanomaterials**, v. 5, n. 4, p. 1716-1731, 2015.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J. et al. An electrochemical evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endo/xenobiotics of pharmacological relevance. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 1, p. 103-110, 2001. ISSN 1567-5394.

PAEZ, J. I. et al. Spontaneous adsorption of 3, 5-bis (3, 5-dinitrobenzoylamino) benzoic acid onto carbon. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 17, p. 4192-4197, 2009. ISSN 0013-4686.

PAULAI, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009. ISSN 0100-4042.

POURIANAZAR, N. T.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, p. 1-38, 2014. ISSN 1388-0764.

PÉREZ-CRUZ, F. et al. Molecular encapsulation of 5-nitroindazole derivatives in 2, 6-dimethyl- β -cyclodextrin: Electrochemical and spectroscopic studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 13, p. 4604-4611, 2009. ISSN 0968-0896.

QIAN, L.; YANG, X. Polyamidoamine dendrimers-assisted electrodeposition of gold-platinum bimetallic nanoflowers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16672-16678, 2006. ISSN 1520-6106.

- RANG, H. P. et al. Farmacologia. In: (Ed.). **Farmacologia**: Elsevier, 2011.
- RAO, C. N. R. et al. Nanotubes. **ChemPhysChem**, v. 2, n. 2, p. 78-105, 2001. ISSN 1439-7641.
- REMERS, W.; BEARS, S. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, v. 4, 1997.
- RODRIGUES, K. A. F. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015. ISSN 0223-5234.
- ROJAS, M. T. et al. Supported Monolayers Containing Preformed Binding Sites. Synthesis and Interfacial Binding Properties of a Thiolated. β -Cyclodextrin Derivative. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 1, p. 336-343, 1995. ISSN 0002-7863.
- SATIJA, J.; SAI, V.; MUKHERJI, S. Dendrimers in biosensors: Concept and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 38, p. 14367-14386, 2011.
- SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 51, n. 4, p. 660-672, 1949. ISSN 1749-6632.
- SCOTT, R. W.; WILSON, O. M.; CROOKS, R. M. Synthesis, characterization, and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 2, p. 692-704, 2005. ISSN 1520-6106.
- SHCHARBIN, D.; KLAJNERT, B.; BRYSZEWSKA, M. Dendrimers in gene transfection. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 10, p. 1070-1079, 2009. ISSN 0006-2979.
- SHI, X.; MAJOROS, I. J.; BAKER, J. R. Capillary electrophoresis of poly (amidoamine) dendrimers: from simple derivatives to complex multifunctional medical nanodevices. **Molecular pharmaceuticals**, v. 2, n. 4, p. 278-294, 2005. ISSN 1543-8384.
- SILVA, M. P. G. da. **Estudo eletroquímico do 2-[(4-nitrofenil)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[β]tiofeno-3-carbonitrila, sua interação com β -ciclodextrina, DNA e reatividade com oxigênio**. 2014. 47f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2014.
- SKODA, M. et al. Optimizing the PMIRRAS signal from a multilayer system and application to self-assembled monolayers in contact with liquids. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 172, n. 1, p. 21-26, 2009. ISSN 0368-2048.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. Reverté, 2005. ISBN 8429175555.

SORŠAK, E. et al. Application of PAMAM dendrimers in optical sensing. **Analyst**, v. 140, n. 4, p. 976-989, 2015.

SRINIVASAN, K.; STALIN, T.; SIVAKUMAR, K. Spectral and electrochemical study of host–guest inclusion complex between 2, 4-dinitrophenol and β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 94, p. 89-100, 2012.

TANG, B. et al. An improved synthesis of disulfides linked β -cyclodextrin dimer and its analytical application for dequalinium chloride determination by spectrofluorimetry. **Analytica chimica acta**, v. 554, n. 1, p. 31-36, 2005. ISSN 0003-2670.

TAVARES, L. et al. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 138, n. 8, p. 432-436, 1999. ISSN 0006-6648.

TOMALIA, D. A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. **Aldrichimica Acta**, v. 37, n. 2, p. 39-57, 2004.

TOMALIA, D. A.; CHENG, Y. **Dendrimer-based drug delivery systems: from theory to practice**. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 1118275225.

TOMALIA, D. A.; CHRISTENSEN, J. B.; BOAS, U. **Dendrimers, dendrons, and dendritic polymers: discovery, applications, and the future**. Cambridge University Press, 2012. ISBN 0521515807.

TONIN, L. T. D. et al. Comparative study of the trypanocidal activity of the methyl 1-nitrophenyl-1, 2, 3, 4-9H-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylate derivatives and benzimidazole using theoretical calculations and cyclic voltammetry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1745-1750, 2009. ISSN 0223-5234.

TREDICI, I. et al. α -Cyclodextrins chemically modified gold electrode for the determination of nitroaromatic compounds. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 645, n. 1, p. 22-27, 2010. ISSN 1572-6657.

VASUMATHI, V. et al. Structure of a carbon nanotube–dendrimer composite. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1372-1380, 2013.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VIJAYARAGHAVAN, G.; STEVENSON, K. J. Synergistic assembly of dendrimer-templated platinum catalysts on nitrogen-doped carbon nanotube electrodes for oxygen reduction. **Langmuir**, v. 23, n. 10, p. 5279-5282, 2007. ISSN 0743-7463.

WANG, F. et al. Modulating β -lapachone release from polymer millirods through cyclodextrin complexation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 10, p. 2309-2319, 2006. ISSN 1520-6017.

WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 7-14, 2005. ISSN 1521-4109.

WANG, K.-L. et al. Synthesis, optical and electrochemical properties of new hyperbranched poly (triphenylamine amide) s. **Polymer**, v. 49, n. 19, p. 4087-4093, 2008. ISSN 0032-3861.

WANG, R.; YU, Z. Validity and reliability of Benesi-Hildebrand method. **Acta Physico-Chimica Sinica**, v. 23, n. 9, p. 1353-1359, 2007. ISSN 1872-1508.

WU, M.-S. et al. Novel "signal-on" electrochemiluminescence biosensor for the detection of PSA based on resonance energy transfer. **Talanta**, v. 161, p. 271-277, 2016. ISSN 0039-9140.

YAM, C. M. et al. Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin–biotin binding of poly (amidoamine) dendrimers functionalized with oligo (ethylene glycol) on gold. **Journal of colloid and interface science**, v. 296, n. 1, p. 118-130, 2006. ISSN 0021-9797.

YANG, C. et al. The Performance of the Benesi-Hildebrand Method in Measuring the Binding Constants of the Cyclodextrin Complexation. **Analytical sciences**, v. 16, n. 5, p. 537-539, 2000. ISSN 0910-6340.

ZENG, Y.-L. et al. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly (amidoamine) dendrimer for mediator-free glucose biosensor. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 1, p. 185-190, 2007. ISSN 1388-2481.

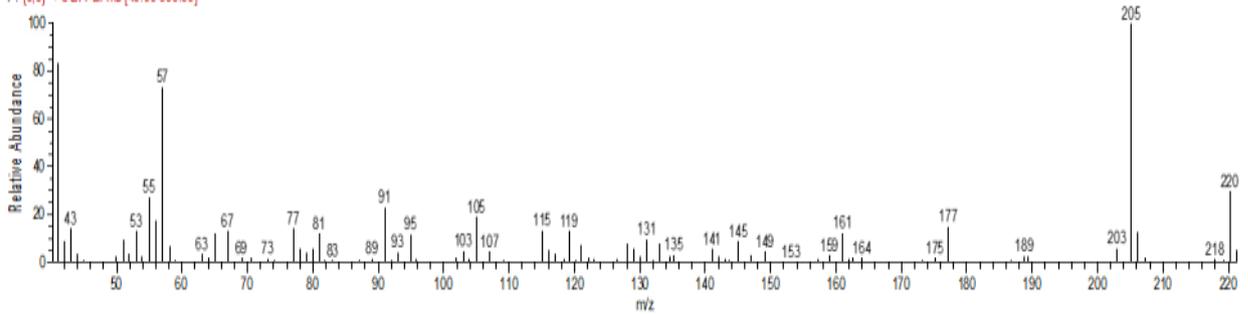
ZHU, X. et al. Label-free electrochemical detection of Avian Influenza Virus genotype utilizing multi-walled carbon nanotubes–cobalt phthalocyanine–PAMAM nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 7, p. 1543-1546, 2009. ISSN 1388-2481.

ZUO, F. et al. Supramolecular Assembly of β -Cyclodextrin-Capped Gold Nanoparticles on Ferrocene-Functionalized ITO Surface for Enhanced Voltammetric Analysis of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 20, n. 8, p. 894-899, 2008. ISSN 1521-4109.

ANEXO

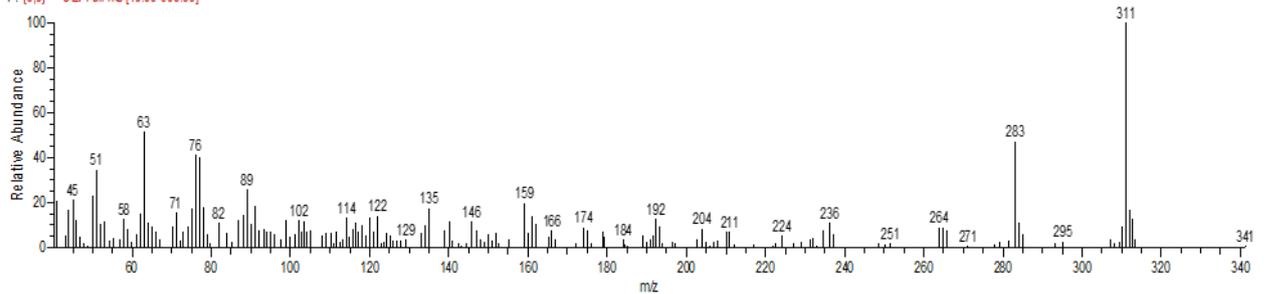
Anexo A – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 14min 21s do cromatograma “a” (Figura 31)

p0202-f #2016 RT: 14.21 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 5.39E5
F: (0,0) + c EI Full ms [40.00-600.00]



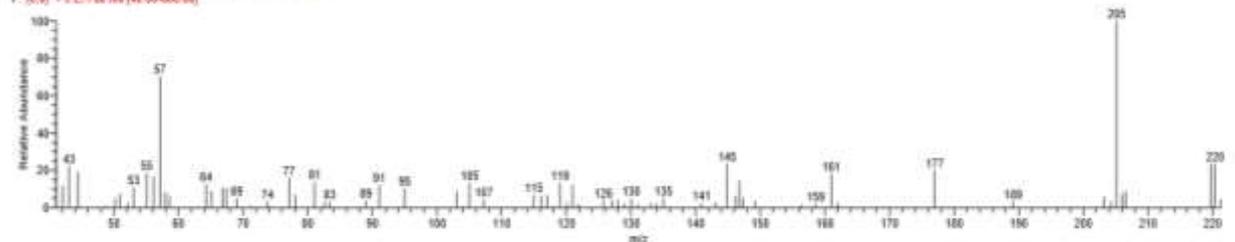
Anexo B – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 29min do cromatograma “a” (Figura 31)

p0202-f #4935 RT: 29.00 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 2.17E5
F: (0,0) + c EI Full ms [40.00-600.00]

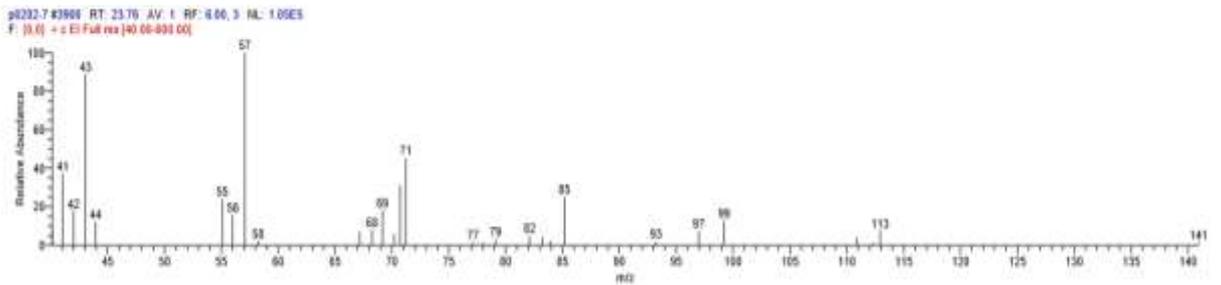


Anexo C – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 14min 20s do cromatograma “b” (Figura 31)

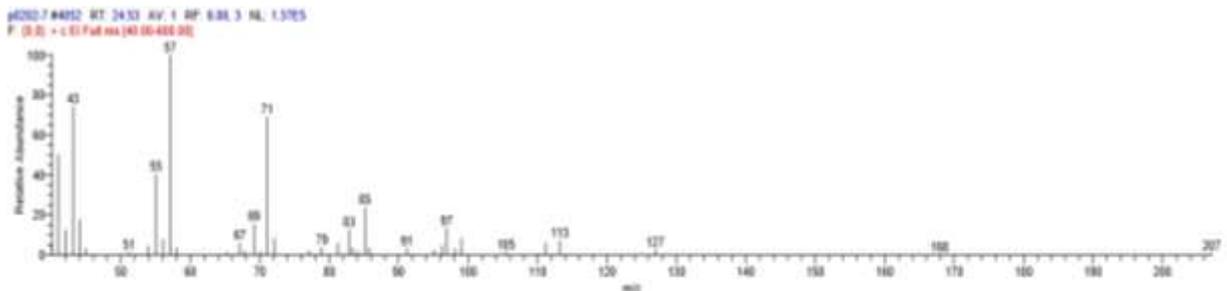
p0202-f #2914 RT: 14.20 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 1.34E5
F: (0,0) + c EI Full ms [40.00-600.00]



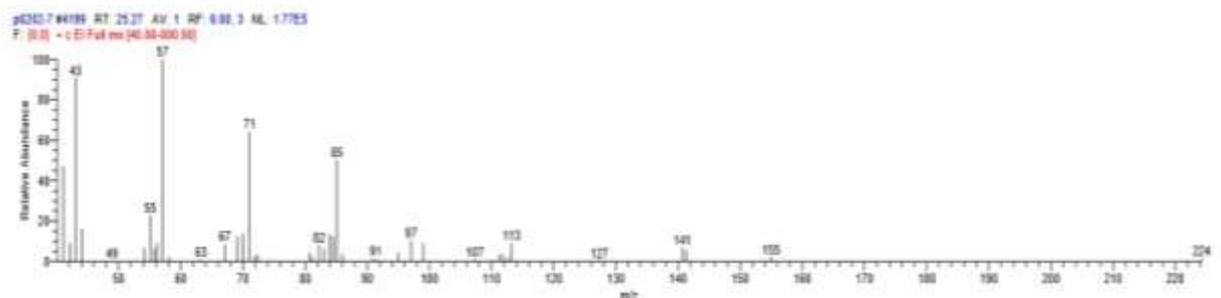
Anexo D – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 23min 76s do cromatograma “b” (Figura 31)



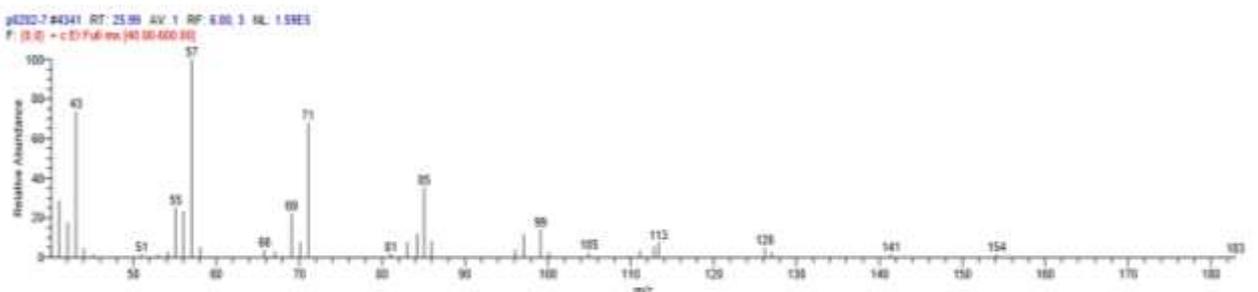
Anexo E – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 24min 53s do cromatograma “b” (Figura 31)



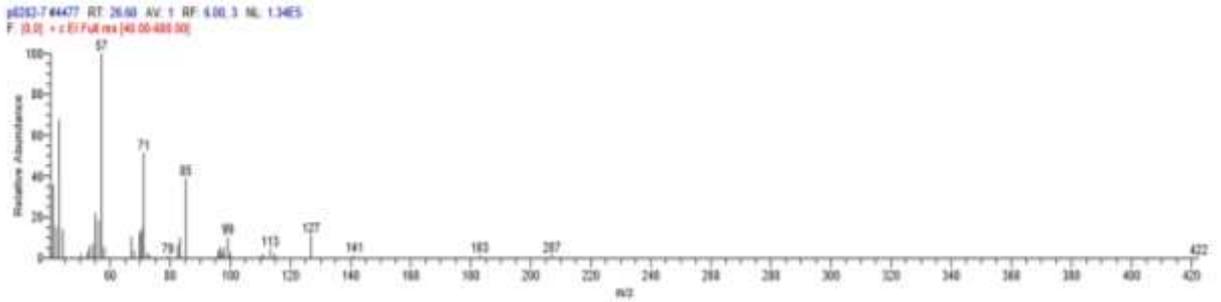
Anexo F – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 25min 27s do cromatograma “b” (Figura 31)



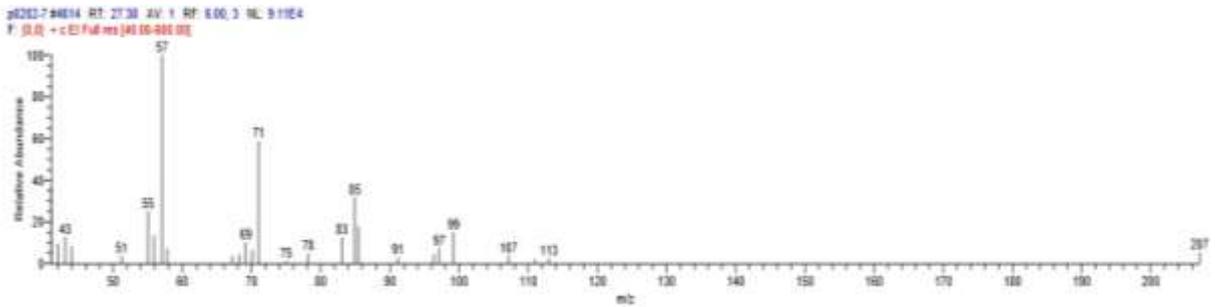
Anexo G – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 25min 99s do cromatograma “b” (Figura 31)



Anexo H – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 26min 68s do cromatograma “b” (Figura 31)



Anexo I – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 27min 38s do cromatograma “b” (Figura 31)



Anexo J – Espectro de massa do composto identificado no tempo de retenção de 29min 01s do cromatograma “b” (Figura 31)

