



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB

ANASTÁCIO ARMANDO BOANE

**INVESTIGAÇÃO BIO-ELETROQUÍMICA DO METRONIDAZOL E SEUS
DERIVADOS**

Maceió-AL

2015

ANASTÁCIO ARMANDO BOANE

**INVESTIGAÇÃO BIO-ELETROQUÍMICA DO METRONIDAZOL E SEUS
DERIVADOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientadora: Dra. Fabricia da Rocha Ferreira

Maceió-AL
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

B662i Boane, Anastácio Armando.
Investigação bio-eletróquímica do metronidazol e seus derivados /
Anastácio Armando Boane. – Maceió, 2015.

122 f. : il

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Coorientadora: Fabrícia da Rocha Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 107-121.

Anexo: f. 122.

1. Bioeletroquímica. 2. Metronidazol. 3. Nitroaromáticos. 4. Eletrões –
– Transferência. 5. Atividade giardicida. I. Título.

CDU: 544.6:57



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



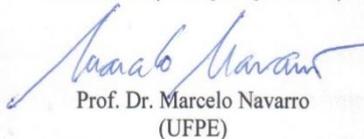
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

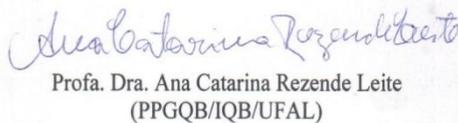
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Anastácio Armando Boane**, intitulada: **“Investigação Bio-eletrouímica do Metronidazol e Seus Derivados”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 30 de janeiro de 2015, às 14h00, na Sala de Reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

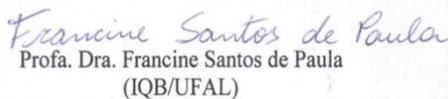
COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora (PPQQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Marcelo Navarro
(UFPE)


Prof. Dra. Ana Catarina Rezende Leite
(PPQQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Antonio Albuquerque de Souza
(UFAL)


Prof. Dra. Francine Santos de Paula
(IQB/UFAL)


Prof. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura
(PPGCF/UFAL)


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
(PPQQB/IQB/UFAL)

- ♣ À Minha esposa Neuza Alice Fernando Majaia Boane e meu filho Emanuel Neustácio Boane;
- ♣ Aos Meus pais Adélia Macuacua, Luís Dias, Fernando Gimo Mabajais e Alzira Alfredo Mafambana;

AGRADECIMENTOS

A Deus Altíssimo e Todo Poderoso autor e consumidor da minha vida;

A minha orientadora Profa. Dra Marília Oliveira Fonseca Goulart por me receber no Brasil com muito carinho e pelo ensinamento e orientação que tenho recebido através dela no campo da ciência. A ela devo todo o meu bem estar no Brasil e não existem palavras para descrever o quão ela é maravilhosa. Muito obrigado Professora.

A Dra. Fabricia da Rocha Ferreira a quem devo muita gratidão pela co-orientação pacífica que ela desenvolveu durante os ensaios.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais pela gentileza no fornecimento dos produtos químicos estudados (metronidazol e seus análogos) bem como ao seu orientando Lucas Lopardi Franco com quem tem colaborado na síntese das substâncias.

Aos Professores: Dra Fabiane Caxico; Dr. Josué Carinhonha, Dra Janaína Bortoluzzi; Dr. Vinicius Del Colle; Dr. Wander Botero; Dr. André Mendonça; Dra Camila Braga Dornelas pelas matérias mediadas durante o processo de ensino-aprendizagem. O meu obrigado vai também a todos os docentes do IQB-UFAL.

À direção do Instituto de Química e Biotecnologia e à Universidade Federal de Alagoas no geral.

Aos amigos e colegas do laboratório Leonardo Vieira, Gleidson Perreira, Orlando Pimentel; Erivaldo Costa, Camila Calado, Thaissa Lúcio, Jadriane Xavier, Mônica Bezerra; Ana Caroline Ferreira, Katherine Lozano, Maria Dayanne Dantas e a todos os integrantes do laboratório de Eletroquímica do IQB.

Aos amigos Domingos Lusitâneo Pierre Macuvele, Aldy, Elton Melo; Sarmiento Júnior Mazivila, Teresa Cossa, Luís Cumbe, Hildizina Joaquim, Alexi Lima, Thales; André Couto, William Henrique.

Ao pastor Mizael e a todos os irmãos da Igreja Presbiteriana do Alto dos Céus. Aos pastores Luís Manuel, Alfredo Bila e Nuro Linganda da Igreja Assembleia de Deus – Moçambique.

Aos meus padrinhos Bento Daniel Mugabe; Mónica Bila Mugabe; Hernane Firmone e Elisinha Firmone.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique, em parceria com o Banco Mundial pela bolsa de estudos concedida e ao Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação do Brasil.

Endereço especial agradecimento aos membros das bancas examinadoras durante a qualificação e defesa da dissertação, pelas sábias e apreciáveis contribuições, as quais foram incorporadas na versão final: Profa. Dra Francine Santos de Paula (IQB/UFAL); Profa. Dra Maria Aline Barros Fidelis de Moura (PPGCF/UFAL); Profa. Dra Ana Catarina Rezende Leite (PPGQB/IQB/UFAL); Prof. Dr. Marcelo Navarro (UFPE); Prof. Dr. António Albuquerque de Souza (IFAL); Prof. Dr. António Euzébio Goulart Santana (PPGQB/IQB/UFAL) e Prof. Dr. Francisco de Assis dos Santos Silva (IFG, Goiás).

Ao meu supervisor da Graduação, Prof. Dr. Elias Narciso Matos, Docente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências Naturais e Matemática da Universidade Pedagógica, Maputo-Moçambique, pelo trabalho maravilhoso realizado durante a graduação assim como pelo incentivo demonstrado para a continuação dos meus estudos, concedendo a carta de recomendação para o concurso à bolsa.

Ao Prof. Dr. Rogério José Uthui, Reitor da Universidade Pedagógica, Moçambique; ao Prof. Dr. André Eduardo Gulube, Diretor da Universidade Pedagógica, Delegação de Massinga; ao Mestre Manuel Bucuto, Diretor da Universidade Pedagógica, Delegação de Niassa; ao Prof. Dr. Geraldo Macalane, docente da Universidade Pedagógica, Delegação de Niassa e ao Prof. Dr. Armindo Ruben Monjane, Docente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências Naturais e Matemática da Universidade Pedagógica, Maputo-Moçambique, pelo apoio por eles demonstrado durante a candidatura à bolsa, assim como posterior liberação para frequentar o mestrado no exterior.

RESUMO

Este trabalho versa sobre a investigação eletroquímica, a correlação dos potenciais do primeiro pico catódico com a atividade giardicida, assim como a reatividade frente ao DNA do metronidazol (MTZ) e seus análogos modificados na cadeia lateral, o fluorado (F-MTZ), o clorado (Cl-MTZ), com azido (N₃-MTZ), o bromado (Br-MTZ), o iodado (I-MTZ), o mesilado (Ms-MTZ) e o tosilado (Ts-MTZ). O estudo foi realizado nos meios aprótico (DMF + TBAPF₆) e prótico (tampão fosfato pH 7,2 com 20% de etanol), utilizando eletrodos de carbono vítreo (ECV) (d = 1 mm), por meio de técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). O mecanismo de redução para o padrão MTZ e seus derivados F-MTZ, Cl-MTZ, N₃-MTZ a 0,100 V s⁻¹, em meio aprótico, é típico de nitroaromáticos, ocorrendo em duas etapas, sendo a primeira de natureza reversível e monoeletrônica, correspondente à formação do ânion radical nitro, seguida por uma onda mais pronunciada em potenciais mais negativos, irreversível e multi-eletrônica, que leva, provavelmente, à formação de derivados nitrosos entre outros produtos de redução estendida. Os análogos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ, com grupos de natureza fortemente abandonadora apresentam o primeiro pico de redução sem o seu correspondente anódico. O perfil voltamétrico é típico de processos eletroquímicos que ocorrem com transferência de elétrons dissociativa, um processo eletroquímico, seguido de reação química acoplada irreversível (EC). Neste meio, a facilidade de redução dos oito compostos representada pelo potencial de redução da primeira onda (E_{plc}), segue a ordem: I-MTZ > Cl-MTZ > Ts-MTZ > Br-MTZ > Ms-MTZ > N₃-MTZ > F-MTZ > MTZ que mostra uma tendência de redução mais fácil para derivados com grupos fortemente abandonadores. Esta tendência correlaciona-se às atividades biológicas dos mesmos, principalmente contra *Giardia lamblia*. Em meio prótico, o mecanismo de redução, conforme esperado, é totalmente diferente, caracterizando-se por um único pico de redução irreversível e bem definido em potenciais menos catódicos que em meio aprótico e correspondente à formação de hidroxilaminas ao consumir-se 4 e⁻/4 H⁺. O MTZ mostrou interagir, apenas, sutilmente com o DNA por espectroscopia UV-Vis em tampão fosfato pH 7,2 com 20% de etanol. Por VPD, em ECV (d = 3 mm), numa solução tampão acetato pH 4.5 com 20% de etanol verificou-se não ter havido qualquer interação entre os oito compostos com o filme de dsDNA, mas quando se fez a aplicação de potencial de redução característico dos mesmos, por tempos definidos, formaram-se produtos de redução que interagiram com o filme de dsDNA, com evidência em VPD, de picos anódicos em potenciais de oxidação típicos das bases guanina e adenina. Diferentemente do filme de dsDNA, em solução de ssDNA, os oito compostos mostraram-se ativos, mesmo sem se executar a etapa de pré-condicionamento redutivo, entretanto, quando se aplica o potencial de redução, a interação é mais significativa para a maioria dos compostos. Nessa interação, ocorre a diminuição da corrente de oxidação e deslocamentos do pico de potencial das bases constituintes para valores mais positivos. Estes fatos sugerem que o DNA pode ser um alvo potencial no mecanismo de ação molecular destes compostos.

Palavras-chave: Metronidazol e derivados. Bioeletroquímica de nitroaromáticos. Transferência de elétrons dissociativa. dsDNA. ssDNA. Mecanismo molecular de ação.

ABSTRACT

This work investigates the electrochemical behavior, the correlation between the potential of the first reduction peak with giardicidal activity, as well as the interaction with DNA of metronidazole (MTZ) and its derivatives, modified in the lateral chain by fluoride (F-MTZ), chloride (Cl-MTZ), azide (N₃-MTZ), bromide (Br-MTZ), iodide (I-MTZ), mesyl (Ms-MTZ) and tosyl (Ts-MTZ) groups. The study was performed in aprotic (DMF + TBAPF₆) and in aqueous media (phosphate buffer solution pH 7.2 with 20% ethanol) using glassy carbon (GCE) (d = 1 mm) electrode, using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV). The mechanism for the reduction of MTZ and its derivatives F-MTZ, Cl-MTZ, N₃-MTZ, at 0.100 V s⁻¹ is typical of nitroaromatic compounds and occurs in two stages, the first is monoelectronic, with a reversible nature, corresponding to the nitro anion radical formation, followed by a more pronounced wave at more negative potential, irreversible and multi-electronic which probably leads to the formation of nitroso derivative and other products with extended reduction. The analogues Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ and Ts-MTZ, with strong leaving groups, present the first reduction peaks without their anodic counterparts, which are more intense than the second ones, a typical behavior of dissociative electron transfer, an EC process (electron transfer followed by a irreversible chemical reaction). In this medium, the facility of reduction of the eight substrates represented by the reduction potential of the first wave (E_{plc}) follows the order: I-MTZ > Cl-MTZ > Ts-MTZ > Br-MTZ > Ms-MTZ > N₃-MTZ > F-MTZ > MTZ showing an easier reduction for derivatives with strong leaving groups. This finding shows correlation with biological activity, mainly against *Giardia lamblia*. In protic medium, the reduction mechanism is, as expected, entirely different, being characterized by only one irreversible well-defined reduction peak at less cathodic potentials than in aprotic medium, which corresponds to the formation of hydroxylamine when 4 e⁻/4 H⁺ are consumed. We also investigated the interaction of the compounds with DNA. MTZ showed a slight interaction with dsDNA by UV-Vis spectroscopy in phosphate buffer pH 7.2 with 20% ethanol. Using DPV at a GCE (d = 3 mm), in acetate buffer, pH 4.5, with 20% ethanol, it was found that practically no interaction occurs between the eight compounds with the film of dsDNA. After electrochemical reduction of the compounds, at adequate cathodic potentials, interaction with the dsDNA film was evidenced, with the presence of the diagnostic anodic peaks at potentials typical of guanine and adenine bases. A different behavior was evidenced in ssDNA solution. All the nitrocompounds interact with ssDNA, even without the step of reductive pre-conditioning, however, the interaction is more intense after reduction. Decrease and shifts of the peak potential of ssDNA towards more positive values are observed. These facts suggest that DNA might be a potential target for these biologically active compounds.

Keywords: Metronidazole and derivatives. Bioelectrochemistry of nitroaromatics. Dissociative electron transfer. dsDNA. ssDNA. Molecular mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas Químicas de Nitrocompostos (alguns exemplos de compostos medicinalmente ativos)	19
Figura 2-	Mecanismo geral de oxido-redução biológica de nitrocompostos nos meios prótico e aprótico.....	21
Figura 3-	Proposta da ativação de um nitroaromático (Benznidazol) por nitroredutases que conduz aos metabólitos redutivos os quais podem causar efeitos nocivos, incluindo danos ao DNA e depleção de tióis. Esta via ocorre durante a redução anaeróbia de 2-nitroimidazóis em sistemas de mamíferos.....	23
Figura 4-	Estruturas químicas de Nitroimidazois (5-Nitroimidazóis, Metronidazol e 2-Nitroimidazóis, Misonidazol)	25
Figura 5-	Sinal de excitação em forma de onda triangular potencial-tempo em um experimento voltamétrico cíclico	31
Figura 6-	Voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível $O + ne^- \rightleftharpoons R$. Esta é uma resposta esperada de um par redox reversível durante um único ciclo de potencial.	31
Figura 7-	Voltamograma cíclico para processos redox irreversível (curva A) e quase-reversível (curva B)	34
Figura 8-	Redução de compostos 5-nitroimidazois (5-NIs) a partir do par PFOR/Fd. A redução ocorre em anaeróbios como <i>Giardia lamblia</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Entamoeba histolytica</i> . Durante a descarboxilação oxidativa do piruvato, a ferredoxina (Fd) é em si reduzida pela enzima piruvato: ferredoxina oxidorredutase (PFOR), ao receber elétrons dela, sendo que depois doa um (1) elétron que reduz o grupo nitro (R-NO ₂) dos 5-NIs	38
Figura 9-	Proposta recente para a redução do MTZ em anaeróbios <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Entamoeba histolytica</i> . Esta redução ocorre via flavina (FAD) e (NADPH)-redutase, dependente da tiorredoxina redutase (TrxR), que age diretamente sobre metronidazol como uma nitroredutase.....	39
Figura 10-	Esquema resumo da atuação dos nitrocompostos	40
Figura 11-	Mecanismo hipotético de transferência de elétrons dissociativa.....	41
Figura 12-	Mecanismo de transferência eletrônica do sistema pi do grupo eletroatraente ao sistema sigma ortogonal C-X e consequente quebra.....	42
Figura 13-	Esquema resumo dos processos envolvendo o DNA	45

Figura 14-	Mecanismo de oxidação para as bases, (a) guanina e (b) adenina.....	47
Figura 15-	Mecanismo sugestivo da interação do DNA com agentes alquilantes bifuncionais com extremidades eletrofílicas (A e B)	51
Figura 16-	Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), tampão acetato (0,1 M), pH 4,5: voltamograma de linha vermelha, ssDNA (1°); linha preta cheia, dsDNA (1°) e linha preta pontilhada dsDNA (40°).....	52
Figura 17-	Ciclo biológico da <i>Giardia lamblia</i> : (1) colônias de <i>G. lamblia</i> aderida à mucosa duodenal; (2) eliminação de trofozoítas em fezes diarreicas, que perecem ao chegar no exterior; (3) eliminação de cistos em fezes sólidas; (4) e 5) ingestão de cistos junto com alimentos ou água contaminada, que ao chegarem no duodeno formam colônias.....	53
Figura 18 -	Voltamogramas cíclicos de MTZ e seus derivados em DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$; eletrodo de carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$); $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	64
Figura 19-	Racionalização mecanística das etapas envolvidas no processo de redução dos compostos do conjunto A em meio aprótico	66
Figura 20-	Figura 20 - Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$ (DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N ₃ -MTZ.....	68
Figura 21-	Figura 21 - Gráfico da relação entre o potencial do pico catódico (E_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N ₃ -MTZ.....	70
Figura 22-	Voltamogramas cíclicos em velocidades diferentes ($v = 0,0350, 0,100 \text{ e } 0,200 \text{ V s}^{-1}$) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N ₃ -MTZ; (DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$)	71
Figura 23 -	Voltamogramas cíclicos em varreduras sucessivas para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N ₃ -MTZ; (DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$); $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	72
Figura 24-	Voltamogramas cíclicos dos derivados do MTZ em DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$; ECV ($d = 1 \text{ mm}$); $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	73
Figura 25-	Racionalização mecanística das etapas envolvidas no processo de transferência de elétrons dissociativa para os compostos com grupos fortemente abandonadores.....	74
Figura 26-	Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda em função da raiz quadrada da velocidade, $v^{1/2}$ (DMF + TBAPF ₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$)	

	para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ.....	75
Figura 27-	Gráfico da relação entre o potencial do pico catódico (I_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (DMF + TBAPF ₆ 0,100 mol L ⁻¹) para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ	76
Figura 28-	Voltamogramas cíclicos em velocidades diferentes ($v = 0,0350, 0,100$ e $0,200$ V s ⁻¹ , $c = 2,0$ mmol L ⁻¹ para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ (DMF + TBAPF ₆ 0,100 mol L ⁻¹)	77
Figura 29-	Voltamogramas cíclicos em varreduras sucessivas para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ (DMF + TBAPF ₆ 0,100 mol L ⁻¹); $v = 0,100$ V s ⁻¹	78
Figura 30-	Voltamogramas de onda quadrada dos compostos registrados em carbono vítreo ($d = 1$ mm; $c = 2$ mmol L ⁻¹ ; DMF + TBAPF ₆ 0,100 mol L ⁻¹); $v = 0,100$ V s ⁻¹ , Amplitude de pulso = 50 mV, $f = 100$ s ⁻¹ com a separação das componentes de corrente direta (—), reversa (—) e resultante (—).....	79
Figura 31-	Voltamogramas cíclicos do MTZ e seus análogos registrados em carbono vítreo ($d = 1$ mm; $c = 1,0$ mmol L ⁻¹ , meio aquoso etanólico (20%)); $v = 0,100$ V s ⁻¹	82
Figura 32-	Racionalização mecanística da etapa eletroquímica envolvida na redução dos compostos em meio aquoso	84
Figura 33-	a) Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda de redução do derivado azida (N ₃ -MTZ) em função da raiz quadrada da velocidade, $v^{1/2}$; b) Gráfico da relação entre o potencial de corrente do pico catódico (E_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (Tampão fosfato; pH 7,2), $c = 1,0$ mmol; $v = 0,100$ V s ⁻¹	85
Figura 34-	Voltamogramas cíclicos de (a) Br-MTZ e (b) I-MTZ registrados em eletrodo de ouro ($d = 3$ mm; $c = 2,0$ mmol L ⁻¹ ; DMF + TBAPF ₆ 0,100 mol L ⁻¹); $v = 0,100$ V s ⁻¹	85
Figura 35-	Espectros de absorção UV-Vis da interação do MTZ com o DNA: a) 20 μ M de MTZ na presença de diferentes concentrações de DNA (2 -12 μ L, 10 mg/mL); b) 5 μ L de DNA (10 mg/mL) na presença diferentes concentrações de MTZ. Solução de tampão Fosfato (0,1 mol L ⁻¹), pH 7,2	88
Figura 36-	Gráficos da interação do MTZ com o DNA. a) Adição de quantidades crescentes de dsDNA em 20 μ mol L ⁻¹ de MTZ. b) Adição de quantidades crescentes de MTZ em 5 mg ml ⁻¹ de dsDNA. Dados obtidos pela espectroscopia UV-Vis. Solução de tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹), pH 7,2.....	89
Figura 37	Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—);	

composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP¹ (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP² (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—). Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. 91
 Amplitude de pulso 50 mV.....

Figura 38- Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos interagindo com a solução de ssDNA em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. ssDNA (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—);ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ /CAP (—); $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV..... 98

¹ Sem aplicação de potencial

² Com aplicação de potencial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade antimicrobiana do metronidazol	26
Tabela 2 -	Dados farmacocinéticos do metronidazol	27
Tabela 3 -	Avaliação citotóxica do MTZ e seus análogos	28
Tabela 4 -	Sensores eletroquímicos de DNA empregados para a análise de interação com diferentes nitrocompostos.....	49
Tabela 5 -	Metronidazol e seus análogos. a) Conjunto A: compostos com substituintes sem carácter fortemente abandonador; b) Conjunto B: compostos com substituintes com carácter fortemente abandonador.....	56
Tabela 6 -	Análise da razão $I_{pc}/v^{1/2}$ para os compostos MTZ (a), F-MTZ (b), Cl-MTZ (c) e N ₃ -MTZ (d).....	67
Tabela 7 -	Parâmetros eletroquímicos para os compostos do conjunto A. Eletrodo de Carbono Vítreo (d = 1 mm), E/V vs. Ag AgCl Cl ⁻ (sat.), $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	70
Tabela 8 -	Parâmetros eletroquímicos para os substratos do conjunto B. Eletrodo de Carbono Vítreo (d = 1 mm), E/V vs. Ag AgCl Cl ⁻ (sat.), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	76
Tabela 9 -	Parâmetros eletroquímicos para os compostos (potenciais aplicados) registrados por VPD. Eletrodo de Carbono Vítreo (d = 3 mm), E/V vs. Ag AgCl Cl ⁻ (sat.), $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV.....	90
Tabela 10 -	Valores de IC ₅₀ sobre avaliação da atividade giardicida do padrão MTZ e alguns dos seus análogos em trofozoítos, in vivo utilizando gerbilos (<i>Meriones unguiculatus</i>) como um modelo experimental	102
Tabela 11 -	Ordem de facilidade de redução dos compostos definida pelos potenciais do primeiro pico catódico.....	102
Tabela 12 -	Grupos abandonadores listados pela ordem aproximada da capacidade de sair	122
Tabela 13 -	Constantes relativas de solvólise de ésteres 1-feniletila e haletos	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Br-MTZ	1-(2-Bromoetil)-2-metil-5-nitroimidazol
BNZ	<i>N</i> -benzil-2-(2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il) acetamida (Benznidazol)
CI ₅₀	Concentração média inibitória
Cl-MTZ	1-(2-Cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECE	Mecanismo de transferência multi-eletrônico com intervenção de reação química
EO	Estresse Oxidativo
EEUU	Estados Unidos
Ep	Potencial de pico
<i>Ep</i> /2	Potencial de pico à meia altura
<i>Epa</i>	Potencial do pico anódico
<i>Epc</i>	Potencial do pico catódico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
Fd	Ferredoxina
F-MTZ	1-(2-Fluoretil)-2-metil-5-nitroimidazol
HMDE	Eletrodo gotejante de mercúrio
<i>i</i>	Corrente
IFG	Instituto Federal de Goiás
IFAL	Instituto Federal de Alagoas
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
I-MTZ	1-(2-Iodoetil)-2-metil-5-nitroimidazol
<i>ipa</i>	Corrente do pico anódico
<i>ipc</i>	Corrente do pico catódico
<i>ipd</i>	Corrente de pico direto
<i>ipr</i>	Corrente de pico reverso

MM	Massa Molar
Ms-MTZ	1-(2-Mesiloxietil)-2-metil-5-nitroimidazol
MTZ	1-(2-Hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (Metronidazol)
N ₃ .MTZ	1-(2-Azidaetil)-2-metil-5-nitroimidazol
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	β- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NFX	(<i>R,S</i>)-3-metil- <i>N</i> -[(1 <i>E</i>)-(5-nitro-2-furil)metileno]tiomorfolin-4-amino 1,1-dióxido (nifurtimox)
NHs	Nitro-heterociclos
PFOF	Piruvato: ferredoxina oxidoreductase
PPGCF	Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
PPGQB	Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
ssDNA	Ácido desoxirribonucléico em fita simples
SOD	Superóxido dismutase
TE	Transferência de elétrons
TED	Transferência de elétrons dissociativa
(Fe(<i>n</i> -TMPyP))	Porfirinas de ferro solúveis em água
TrxR	Tiorredoxina reductase
Ts-MTZ	1-(2-Tosiloxietil)-2-metil-5-nitroimidazol
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VC	Voltametria Cíclica
VOQ/SWV	Voltametria de onda quadrada/ Square Wave Voltammetry
VPD/DPV	Voltametria de Pulso Diferencial/Differential Pulse Voltammetry
Δ <i>E</i> _p	Separação dos potenciais de pico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Compostos biologicamente ativos	18
1.1.1	Nitrocompostos	18
1.1.2	Nitroimidazóis	24
1.1.3	Metronidazol e seus derivados	26
1.1.4	Técnicas eletroquímicas	29
1.1.5	Eletroquímica do Metronidazol e seus derivados	36
1.1.7	Processo de grafting	41
1.1.8	Biossensor de DNA	43
1.1.6	Giardia lamblia	52
2	OBJETIVOS	55
2.1	Geral	55
2.2	Objetivos Específicos	55
3	EXPERIMENTAL	56
3.1	Produtos químicos e solventes	56
3.2	Preparações químicas	56
3.3	Estudos Eletroquímicos	58
3.3.1	Ensaio em meio aprótico	58
3.3.2	Ensaio em meio prótico	60
3.4	Investigações da interação dos compostos com DNA (Calf Thymus)	60
3.4.2	Investigações da interação dos compostos com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	60
3.4.2.1	Preparo do gel de dsDNA e estudo da interação do filme formado com as amostras em análise (MTZ e seus análogos)	60
3.4.2.2	Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base e estudo da interação da mesma com as amostras	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	Estudo do Metronidazol e seus análogos em meio aprótico por voltametria cíclica	63
4.1.1	Análise do perfil voltamétrico dos substratos agrupados no conjunto A	63
4.1.2	Análise do perfil voltamétrico dos compostos no conjunto B	72
4.2	Perfil dos voltamogramas de VOQ para todos os compostos em meio aprótico	79
4.3	Estudo do Metronidazol e seus análogos em meio aquoso por voltametria cíclica	81
4.4	Feição voltamétrica dos derivados Br-MTZ e I-MTZ no eletrodo de ouro	85
4.5	Estudos da interação dos compostos com o Ácido Desoxirribonucleico	87
4.5.1	Estudo espectroscópico da interação do Metronidazol com o dsDNA	87

4.5.2	Estudo da interação dos compostos com o biossensor de DNA utilizando VPD.	90
4.5.3	Estudo da interação dos compostos com sensor de ssDNA utilizando VPD.	98
4.6	AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE GIARDICIDA	102
5	CONCLUSÕES	104
6	PERSPECTIVAS	106
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista biológico, os nitroaromáticos formam uma classe importante de compostos biologicamente ativos (ANDRES; ECMANN; SMITH 2013), fomentando, dessa forma, forte interesse na investigação da sua ação molecular como fármacos e/ou candidatos a fármacos, utilizando diversos métodos de análise.

A eletroquímica e os seus métodos são ferramentas úteis na investigação e percepção do comportamento dos fármacos e/ou pró-fármacos, principalmente quanto à elucidação dos mecanismos de transferência de elétrons, com reações acopladas bem como na investigação da interação de intermediários de redução com macromoléculas específicas nos organismos vivos (ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013).

Estes estudos são desenvolvidos em diferentes meios, aprótico, misto (orgânico/aquoso) e puramente aquoso, tendo como resultados, diferentes comportamentos eletroquímicos. Na correlação com atividades biológicas, há necessidade de mimetizar os vários ambientes celulares, em organelas e outros.

Estes ambientes podem ser hidrofílicos ou lipofílicos e os processos redox podem ser realizados em meios não aquosos, assemelhando-se à situação em sistemas lipofílicos (em membranas, sítios ativos de proteínas, etc.) ou em meios aquosos correspondendo às situações em muitos fluidos citoplasmáticos biológicos (CAVALCANTI et al, 2004; De PAIVA et al, 2012). Estudos em meio aprótico revelam-se importantes, objetivando a correlação dos potenciais redox com as atividades biológicas, porque isto também permite a obtenção de potenciais relacionados às transferências mono-eletrônicas (CAVALCANTI et al, 2004).

O interesse dos eletroquímicos pelos compostos nitrados data de longa data (1900), quando Haber revelou as etapas de redução do nitrobenzeno. O interesse por essa classe de compostos tem crescido, uma vez que são sintetizados para usos farmacêuticos e, conseqüentemente, eles são administrados em células vivas onde são frequentemente metabolizados por meio de processos do tipo redox (SQUELLA; BOLLO; NÚÑEZ-VERGARA, 2005). Os nitrocompostos são extensivamente utilizados como agentes antimicrobianos e anticancerígenos (MANDAL, 2004). Nitroimidazóis são nitro-heterociclos utilizados amplamente no tratamento de doenças infecciosas, quer nas terapias humanas assim como não

humanas (CARBAJO et al, 2002; BOLLO et al, 2010), especificamente como fármacos radiosensibilizadores, antibacterianos e antiprotozoários (SQUELLA et al, 2006; AHMED et al, 2012). Presume-se que sua ação antimicrobiana resida na redução do grupo nitro nos microrganismos patogênicos, com formação de metabólitos reduzidos, os quais interagem com o DNA, causando, assim, danos na estrutura microbiana e dificultando sua reprodução (CARBAJO, 2002; MANDAL, 2004; BOLLO et al, 2010)

O metronidazol (MTZ) é um nitroimidazol amplamente usado como antimicrobiano (CAVALCANTI et al, 2004; BUSATTI et al, 2013). Entretanto, particularmente para a atividade giardicida, verifica-se que a *Giardia lamblia* tem desenvolvido resistência contra muitos fármacos incluindo o MTZ, havendo necessidade de desenvolvimento de novos fármacos. Análogos do MTZ desenvolvidos pela substituição da posição lateral foram testados em diversos microrganismos, tendo-se mostrado eficazes contra a giardíase, tricomoníase e amebíase (BUSATTI et al, 2013).

O presente trabalho apresenta resultados obtidos no estudo do comportamento eletroquímico de redução do grupo nitro e a correlação dos potenciais do primeiro pico catódico com a atividade giardicida já descrita na literatura, para o MTZ e seus derivados halogenados (F-MTZ, Cl-MTZ; Br-MTZ e I-MTZ), substituídos por azido (N₃-MTZ), mesila (Ms-MTZ) e tosila (Ts-MTZ). Faz-se a comparação dos potenciais dos picos catódicos e anódicos em todos os compostos, a definição do mecanismo envolvido no processo eletroquímico, assim como a análise da interatividade dos mesmos frente ao dsDNA e ssDNA. Para as análises, usaram-se técnicas eletroanalíticas como a Voltametria Cíclica (VC), a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), nos meios aprótico e prótico.

1.1 Compostos biologicamente ativos

1.1.1 Nitrocompostos

Os nitrocompostos têm uma aplicação diversificada, constituindo matéria prima para a síntese de medicamentos, corantes, perfumes, fertilizantes, plásticos e explosivos, entre outros (BADGUDJAR et al, 2007). O maior interesse nessa classe de compostos fundamenta-se na dualidade da sua ação biológica (ANDRES;

ECMANN; SMITH 2013), pois, por um lado são avaliados como compostos nocivos e por outro lado como compostos com ação medicinal, atraindo assim atenção ao longo de décadas.

Muitos são mutagênicos e alguns são cancerígenos (PUROHIT; BASU, 2000; KOVACIC; SOMANATHA, 2014); outros são medicamentos importantes (ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013; KOVACIC; SOMANATHA, 2014) e ainda são avaliados em relação à poluição e toxicidade (KOVACIC; SOMANATHA, 2014). Em particular, vários nitroaromáticos (alguns exemplos na figura 1) são amplamente utilizados como agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções protozoárias anaeróbias potencialmente graves como tricomoníase, amebíase, giardíase, doenças de chagas, etc., e infecções bacterianas anaeróbias causadas por espécies de bacteroides, fusobactérias e *Clostridium difficile*, (TOCHER, 1997; VALDEZ, et al, 2009; LÖFMARK et al, 2010; SANCHEZ-SANCHO, 2010; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013).

A introdução de compostos nitro-heterocíclicos (NHs) como fármacos nos finais de 1950 e 1960 configurou-se em uma nova era no tratamento de bactérias gram-negativas e gram-positivas e uma variedade de protozoários patogênicos. A aplicação destes fármacos tem aumentado desde então e são atualmente utilizados amplamente para o tratamento contra agentes patogênicos anaeróbios (TOWNSON et al 1994; LI et al, 2007; VALDEZ et al, 2009; BUSCHINI et al, 2009; BUSATTI et al, 2013)

Figura 1 - Estruturas Químicas de Nitrocompostos (alguns exemplos de compostos medicinalmente ativos) (continua).

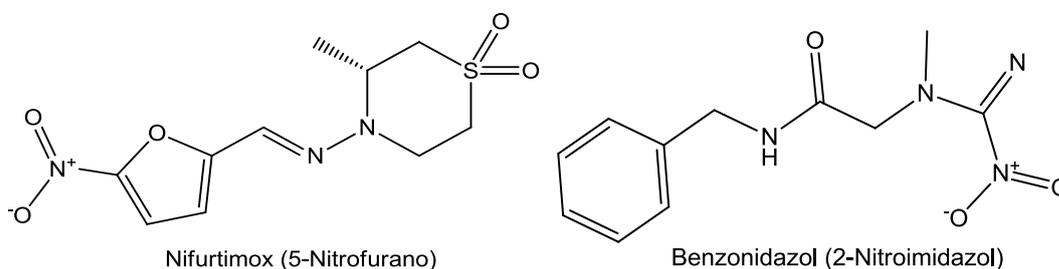
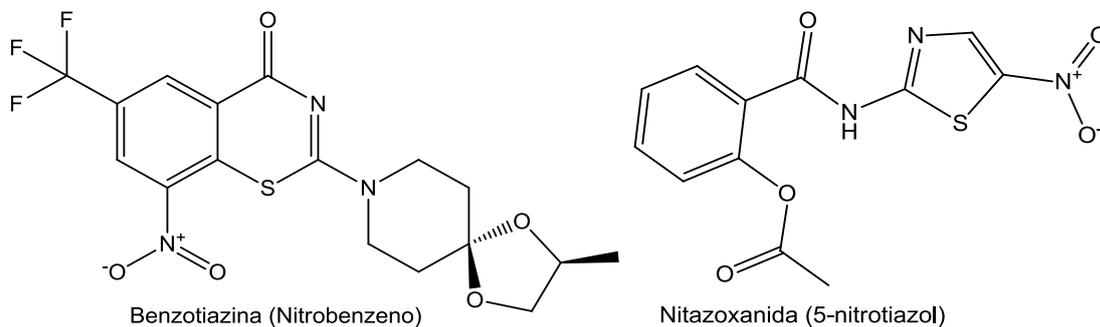


Figura 1 - Estruturas Químicas de Nitrocompostos (alguns exemplos de compostos medicinalmente ativos) (conclusão)

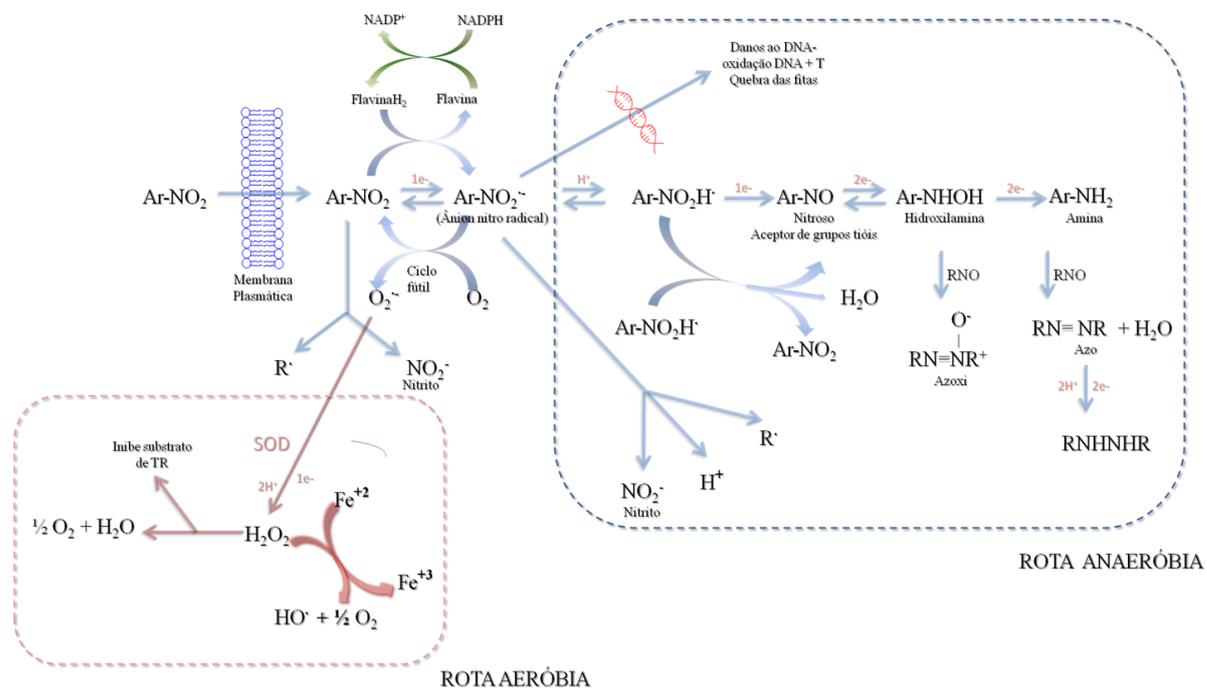


Fonte: ESPOSITO et al, 2005; CARVALHO et al, 2011; ANDRES; ECMANN; SMITH 2013), adaptado.

Numa visão ampla, as diversas classes de compostos nitroaromáticos apresentam vias metabólicas bem delineadas envolvendo um mecanismo de transferência de elétrons catalisado por enzimas redutases que leva à formação de produtos de redução sequencial como ânion radical nitro ($\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$), nitroso (Ar-NO), hidroxilamina (Ar-NHOH) e amina (Ar-NH_2), os quais apresentam diversas ações fisiológicas (LEITSCD et al, 2009; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013; KOVACIC; SOMANATHA, 2014).

A transferência de elétrons (TE), geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo (EO), constituem o principal modo de ação dos mesmos (KOVACIC; SOMANATHA, 2014). Há indícios de que os intermediários reativos formados em meio anaeróbico como $\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$, Ar-NHOH e ânion radical nitro protonado ($\text{Ar-NO}_2\text{H}^{\cdot}$), podem interagir com o DNA celular, provocando danos (CARBAJO, 2002; MANDAL, 2004; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; BOLLO et al, 2010; ANDRES; ECMANN; SMITH 2013). A figura 2, representa a eletroquímica de redução do grupo nitro nos vários ambientes celulares.

Figura 2 - Mecanismo geral de oxido-redução biológica de nitrocompostos nos meios prótico e aprótico.



Fonte: (TOCHER, 1997; LA-SCALEA, 1998; SQUELLA et al, 2005; GOULART et al, 2006; PAULA et al, 2009).

Vários mecanismos de transferência de elétrons (TE) para a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) são possíveis. Está bem estabelecido que ArNHOH pode originar um ciclo redox com ArNO, dando origem ao estresse oxidativo (EO) (KOVACIC; SOMANATHA, 2014), assim como o intermediário Ar-NO₂^{•-} em condições aeróbias pode reduzir o oxigênio com conseqüente formação do ânion radical superóxido (O₂^{•-}) que, por ação da superóxido dismutase (SOD), forma outras espécies reativas de oxigênio (H₂O₂) que são tóxicas às células bacterianas e parasitárias.

Compostos azo e azóxi, provavelmente formados a partir de reações de protonação e condensação que envolvem ArNO, ArNHOH e ArNH₂, podem também levar à geração de EO, após biotransformação. Esses exibem potenciais de redução na faixa susceptível para TE in vivo. (KOVACIC; SOMANATHA, 2014).

Para ambas as famílias de NHs, o grupo nitro é reduzido dos fármacos originais (nitroimidazóis e/ou nitrofuranos) aos radicais nitro semelhantes, contudo o potencial de redução de cada família é diferente, sendo assim, sua atividade biológica pode variar. Presume-se que nos nitroimidazóis, estas vias dependem da

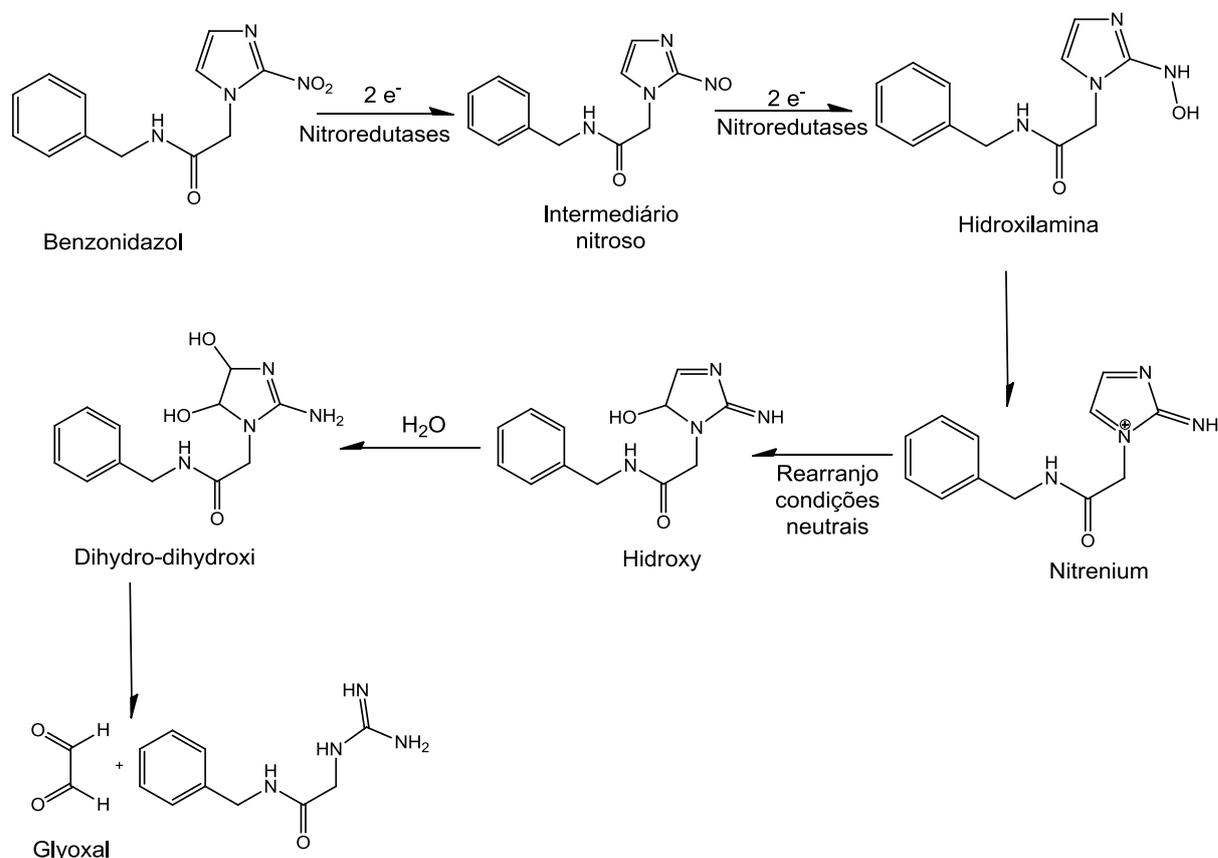
redução por ferredoxina ou flavodoxina enquanto os nitrofuranos requerem atividade da nitroreductase, mas o substrato natural destas enzimas não foi identificado (TOWNSON et al, 1994; SISSON, 2002; HRDÝ et al, 2005).

Os nitroso-arenos (Ar-NO) agem como aceptores de grupos tióis de enzimas detoxificantes, reagindo assim de forma complexa com tióis (EYER, 1994; De SOUZA, 2011), sendo que a formação dos produtos depende de fatores como concentração de tióis, pH e efeito do substituinte (EYER, 1994). Isto leva a uma depleção considerável nas concentrações intracelulares de tióis (MULCAHY et al, 1989; BÉRUBÉ et al, 1991), tanto quanto a formação de adutos com as proteínas através da ligação a resíduos de cisteína (EYER, 1994; EYER; LIERHEIMER; SCHNELLER, 1984; MULCAHY et al, 1989). Deste modo, para além da hipótese de DNA, a morte celular é provocada pela desativação de enzimas-chave devido à formação de adutos entre tióis e nitrosos e/ou pela ruptura do equilíbrio redox da célula através da depleção dos níveis de concentração de tióis intracelulares (De SOUZA, 2011; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013).

As nitroreductases catalisam a ativação dos fármacos (interação de enzimas redutoras e pró-fármaco) pelo mecanismo de ping-pong³. Um exemplo de reação desta natureza é a redução de BNZ (figura 3) por nitro-reductase conduzindo à formação de metabólitos altamente reativos (HALL; WILKINSON, 2012; KOVACIC; SOMANATHA, 2014).

³ É um mecanismo em que as enzimas podem apresentar dois estados: a conformação normal (E) e a conformação modificada quimicamente (E*) ou conformação intermediária, onde, o substrato A une-se à enzima E, que passa a um estado intermediário E*, por exemplo, por transferência de um grupo químico ao centro ativo da enzima, podendo já ser libertado na forma de produto P. Apenas quando o substrato A foi já libertado do centro ativo da enzima, pode-se unir ao substrato B, que devolve a enzima modificada E* ao seu estado original E, e libertá-lo em forma de produto Q.

Figura 3 - Proposta da ativação de um nitroaromático (Benznidazol) por nitroreduzases que conduz aos metabólitos redutivos, os quais podem causar efeitos nocivos, incluindo danos ao DNA e depleção de tióis. Esta via ocorre durante a redução anaeróbia de 2-nitroimidazóis, em sistemas de mamíferos.



Fonte: HALL, & WILKINSON, 2012; KOVACIC & SOMANATHA, 2014, adaptado.

Os métodos eletroquímicos constituem uma ferramenta importante para a elucidação dos mecanismos envolvidos na reatividade dos pró-fármacos nitroaromáticos, ou seja, para se entender as propriedades redox destes, assim como a reatividade dos seus intermediários reduzidos com macromoléculas alvo como DNA e tióis (ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013).

A mudança na proporção de corrente de pico da onda monoelétrica $\text{ArNO}_2/\text{ArNO}_2^{\cdot-}$ do voltamograma cíclico pode ser usada como um meio para quantificar e comparar a reatividade relativa de diferentes substâncias (DNA, Tióis, etc.) com os fármacos reduzidos (TOCHER; EDWARDS, 1992; TOCHER; EDWARDS, 1994; NÚNEZ-VERGARA et al, 1996; NÚNEZ-VERGARA et al, 1998; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013), tendo-se sempre o cuidado de evitar a interferência de prótons na análise. É útil enfatizar que alguns trabalhos da literatura

não fizeram a devida correção do efeito do próton e, portanto, não estão corretos e não devem ser considerados, quando em meio aprótico, com adição de tióis (GOULART et al, 2007)

A redução dos compostos nitroaromáticos em soluções aquosas é realizada em uma única etapa irreversível de 4 elétrons e quatro prótons, levando à hidroxilamina, contrariamente ao que acontece em meios mistos, em que esta redução ocorre em etapas separadas: uma primeira onda de 1 elétron quasi-reversível ao ânion radical nitro, seguida por uma nova redução em potenciais mais negativos para a hidroxilamina, refletindo uma limitação cinética imposta pela protonação termodinamicamente desfavorável do ânion radical, enquanto em solventes apróticos puros, a segunda redução corresponde a um processo totalmente irreversível que leva à formação do ânion radical nitroso, entre outros produtos, sem no entanto evidências da formação da hidroxilamina (ADRES; ECMANN; SMITH, 2013).

1.1.2 Nitroimidazóis

Nitroimidazóis são nitro-heterociclos muito importantes. Eles são utilizados extensivamente no tratamento de infecções anaeróbias e estão sob investigação contínua em relação à sua utilização como citotoxinas de células hipóxicas (BUSCHIMI, et al, 2009), mas também são suspeitadas de serem cancerígenos (KOVACIC; SOMANATHA, 2014). Em um estudo com *Salmonella*, avaliou-se o potencial citotóxico e genotóxico dos fármacos nifurtimox (NFX), benznidazol (BNZ) e metronidazol (MTZ), tendo o mesmo relevado que NFX e BNZ são mais mutagênicos que MTZ. Os efeitos da MTZ, que mostra o potencial de redução relativamente baixo, parecem ser estritamente dependentes das condições anaeróbias/hipóxicas. Ambos, NFX e BNZ, podem não só levar a danos celulares, mas também podem interagir com o DNA, causando danos significativos (BUSCHINI, 2009; KOVACIC; SOMANATHA, 2014).

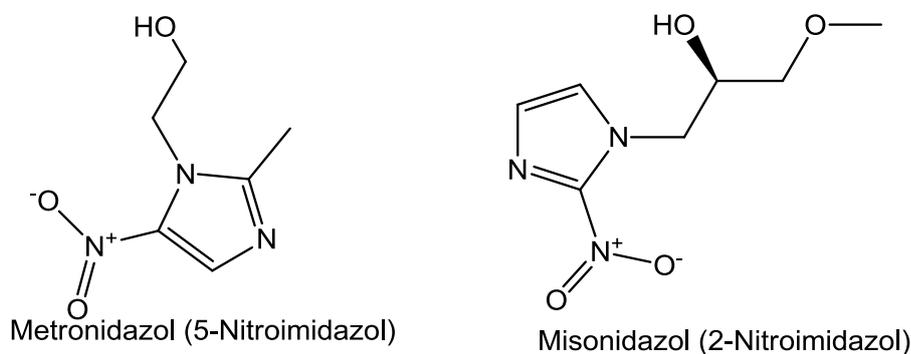
Postula-se que, para os compostos nitroimidazólicos e nitrofurânicos, o mecanismo molecular de ação reside na formação de espécies radicalares ativas que podem infligir danos significativos ao DNA do micróbio alvo, provocando assim a morte celular (EHLHARDT; BIAULIU; GOLDMAN, 1988; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013). No entanto, outras pesquisas sugerem que a espécie ativa é o

derivado nitroso, produto de redução de dois (2) elétrons (EHLHARDT; BIAULIU; GOLDMAN, 1988; LEITSCD, et al, 2009).

Os 5-nitroimidazóis são agora largamente usados para a profilaxia contra a septicemia pós-operatória e no tratamento de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori*⁴ (EDWARDS, 1993; SISSON, 2002; MORETH, M et al, 2010; LEITSCH, 2011). Estes compostos apresentam uma larga gama de efeitos biológicos, sendo que alguns deles são usados amplamente em terapia (PUROHIT; BASU, 2000). Apresentam ação farmacológica ativa contra infecções por protozoários e bactérias e como agentes antitumorais (OLIVEIRA, 2004).

Os nitroimidazóis mais importantes (figura 4) apresentam o núcleo 5-nitroimidazólico com substituintes na posição N₁ do anel heterocíclico aromático, como o metronidazol (1-β-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol, MTZ) e núcleo 2-nitroimidazólico, como o misonidazol [1-metoxi-3-(2-nitroimidazol-1-il) propan-2-ol].

Figura 4 - Estruturas químicas de Nitroimidazóis (5-Nitroimidazóis, Metronidazol e 2-Nitroimidazóis, Misonidazol).



Fonte: KAPOOR, V. K et al, 2003; ANDRES, ECMANN & SMITH, 2013, adaptado

Para as bactérias, as lesões ao DNA derivam da formação de adutos covalentes quanto das quebras nas fitas simples e duplas da macromolécula (DOBIÁŠ et al, 1994, PUROHIT; BASU, 2000; BUSCHINI et al, 2009). Uma vez que na espécie humana, o MTZ é metabolizado fundamentalmente por enzimas ou citocromo P450 de forma a gerar metabólitos oxidativos de ácido acético e hidroxila, acredita-se que a subfamília P450 IA seja a principal responsável, não obstante a

⁴ *Helicobacter pylori* é um microrganismo que contribui para o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais e câncer gástrico [CAVALCANTI et al, 2004].

contribuição das subfamílias IIB, IIC e IIIA (PUROHIT; BASU, 2000). Em condições aeróbias, o MTZ pode ser regenerado após sua redução ao ânion radical nitro em microsomas de fígado, produzindo o ânion superóxido. Entretanto, em condições anaeróbias, os radicais gerados sofrem reduções subseqüentes que podem levar à formação de derivados nitroso, N-hidroxila e amina (PEREZ-REYES; KALYANARAMAN; MASON, 1980; PAULA, SERRANO; TAVARES, 2009; KOVACIC; SOMANATHA, 2014).

1.1.3 Metronidazol e seus derivados

O MTZ é um antibiótico altamente versátil (VALDEZ et al 2009), devido à sua “eficácia”, ao seu perfil de baixo custo e sua segurança (BUSATTI et al 2007). A tabela 1 mostra diversos agentes protozoários e bacterianos alvos do MTZ

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana do metronidazol

Atividade biológica	Agentes susceptíveis	Referências
Anti-protozoária	<i>Giardia lamblia</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Entamoeba histolytica</i>	ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013; UPCROFT; UPCROFT, 2001; KAAKOUSH; MENDZ, 2005; BUSATTI et al 2007; DUNN, 2010.
Anti-bacteriana	<i>Clostridium difficile</i> <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , fusobactérias	TOCHER, 1997; VALDEZ et al, 2009; LÖFMARK et al 2010, SANCHEZ-SANCHO, 2010; ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013.

Fonte: Autor, 2015

O MTZ é rapidamente e quase completamente assimilado pelo intestino, apresentando picos de níveis séricos em torno de 14 µg/mL após a administração de 500 mg para adultos (TOWMSON et al, 1994). Pode também ser administrado em 500-750 mg três vezes por dia durante 10 dias para adultos e 35-50 mg/kg/dia, três vezes por dia, durante 10 dias, em crianças (NAGATTA et al, 2012).

O MTZ pode ser administrado por diversas vias. Em voluntários saudáveis, a sua administração oral é bem eficiente, apresentando pouco tempo para atingir a concentração máxima no soro em pouco tempo. Sua conversão ocorre no fígado (TSAI; CHEN, 2003) e é prontamente absorvido na mucosa intestinal (BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002). Ele pode penetrar bem no fluido cérebro espinhal-sangue e barreira hematoencefálica (TSAI; CHEN, 2003;

BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002). A média de meia-vida para sua eliminação a partir do plasma é de 14.4 horas (TSAI; CHEN, 2003). A tabela 2 resume informações farmacocinéticas sobre o MTZ.

Tabela 2 - Dados farmacocinéticos do Metronidazol

Modo de Administração	Concentração máxima no soro	Tempo no	Disponibilidade/Absorção	Metabólitos	Referência
Oral	8-14 µg/mL após única dose de 500 mg	30-60 minutos	> 90%	Hidroxilados e acetilados	TSAI; CHEN, 2003;
Intravenosa	---	----	----		TOWMSON et al, 1994;
Vaginal	---	8-12 horas	Baixa		BENDESKY; MENÉNDEZ;
Retal	---	----	Baixa		OSTROSKY-WEGMAN, 2002

Fonte: Autor, 2015

Efeitos adversos do MTZ têm sido relatados e incluem náuseas, vômitos, sabor metálico, anorexia e diarreia. Em reações colaterais mais significativas, ele afeta o sistema nervoso central, causando, especificamente, ataxia, tonturas, dores de cabeça, insônia, confusão e neuropatia periférica. Convulsões raramente acontecem em tratamentos prolongados (GERDING, 1987; NAGATTA et al, 2012). Ocorre comprometimento do ritmo cardíaco, devido à quelação de MTZ com íons de cálcio, o que também induz alguns tumores em roedores e é mutagênico a bactérias (GÓMEZ-ARROYO, 2004). As pesquisas não apontam risco cancerígeno ou mutagênico para os seres humanos, após administração de doses normais de MTZ, por períodos de tempo prescrito (HAGER; RAPP, 1992; MORETH et al, 2010). No entanto, os produtos intermediários instáveis resultantes da redução de MTZ aparecem na urina de alguns modelos animais em quantidades suficientes para dar origem ao Teste de Ames⁵ positivo em *Salmonella* sp (TOWMSON et al, 1994) e,

⁵ Teste de Ames é um método amplamente utilizado que usa bactérias para testar se um determinado produto químico pode causar câncer. Mais formalmente, é um ensaio biológico para avaliar o potencial mutagênico de compostos químicos [MORTELMANS & ZEIGER, 2000]

também pelo teste de Ames estudos *in vitro* mostram mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (MORETH et al, 2010).

Apesar de mais de 45 anos de uso intensivo, o MTZ continua a ser o fármaco padrão para a gestão e profilaxia de infecções anaeróbicas (LÖFMARK et al, 2010). Atualmente, o uso de MTZ é indiscutível, destacando-se entre os 100 medicamentos de maior prescrição nos EEUU e faz parte da lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization) (BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002; CAVALCANTI et al, 2004; OLIVEIRA, 2004).

Apesar de sua eficácia, alguns microrganismos anaeróbios têm desenvolvido resistência ao MTZ, criando assim interesse no desenvolvimento de novos fármacos que possam superar a resistência causada por ele. Falhas no tratamento com MTZ e resistência clínica de giardíases têm sido documentados em diversos experimentos (LEMÉE, 2000; UPCROFT; UPCROFT, 2001). Ensaios com 5-nitroimidazóis modificados na posição 1 revelaram maior eficácia contra *T. vaginalis* (LEITSCH, 2011).

Derivados do MTZ podem ser obtidos por modificação da cadeia lateral na posição 1 do anel 5-imidazólico e alguns análogos de 5-nitroimidazóis desenvolvidos mostram eficácia que pode estar relacionada com os seus potenciais de redução (BUSATTI et al, 2007). Townson e colaboradores (1994) afirmam que o potencial de redução do grupo nitroimidazol desempenha um papel importante na atividade giardicida.

Busatti e colaboradores, 2007, avaliaram o efeito citotóxico do MTZ e seus derivados e nenhum efeito citotóxico foi observado em células de mamíferos (tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação citotóxica do MTZ e seus análogos

Compostos avaliados	Faixa de concentração	Grupo avaliado	Efeito citotóxico	Referência
MTZ Br-MTZ I-MTZ N ₃ -MTZ Ms-MTZ	0,2 – 6,4 µM	Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de sete (7) doadores diferentes	Não há efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos induzida por PHA (fito-hemaglutinina)	BUSATTI et al, 2007

Fonte: Autor, 2015

1.1.4 Técnicas eletroquímicas

A eletroquímica tem se mostrado útil em química medicinal. Muitos dos processos fisiológicos consistem em cadeias oxido-redutivas, envolvendo numerosos processos catalisados por enzimas (OLIVEIRA, 2004). Os processos biológicos e eletroquímicos exibem diversas similaridades, pois, ocorrem com transferência de elétrons (TE), de natureza heterogênea e tanto podem ocorrer em meio aquoso assim como não-aquoso (BRETT; BRETT, 1996).

Um dos parâmetros avaliados em processos de TE é o potencial de redução, o qual fornece informações úteis sobre a viabilidade dos processos de transferência de elétrons *in vivo*, quantificando a energética desses processos. Informações disponíveis na literatura estabelecem correlações entre E_{pc} (potencial de redução ou de pico catódico) e atividades biológicas, demonstrando a relevância dos estudos eletroquímicos como ferramentas na elucidação de mecanismos de ação de vários fármacos contra diversas doenças, na previsão e planejamento de compostos biologicamente ativos (BRETT, 1996; De ABREU, 2002).

Os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) da reação de transferência monoelétrica inicial indicam a facilidade de redução, podendo explicar a atividade biológica relacionada a cada um deles (VALDEZ et al, 2009). Parâmetros como E^o ($(E_{pc} + E_{pa})/2$ (para sistemas reversíveis) ou $E_{pc} - E_{pc/2}$ (para sistemas irreversíveis), a função corrente $(I_p/v^{1/2}) \times C$ e I_{pa}/I_{pc} são normalmente empregados na avaliação dos mecanismos eletroquímicos (WARDMAN, 1990).

A redução eletroquímica de nitroimidazóis e particularmente do MTZ tem sido estudada nos diferentes meios, usando-se diversos solventes, principalmente, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e acetonitrila.

1.1.4.1 Técnicas de Varredura de Potencial

As técnicas de varredura de potencial são as mais utilizadas, principalmente por não eletroquímicos para o estudo de diversos processos eletrônicos (BRETT, BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 1944). Consistem na aplicação de um potencial variando continuamente em função de tempo para o eletrodo de trabalho (BRETT; BRETT, 1993) o que resulta na ocorrência de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas na solução (reações faradáticas), possivelmente adsorção de

espécies de acordo com o potencial, e uma corrente capacitiva, devido à dupla camada elétrica.

A principal aplicação das técnicas de varredura de potencial é o diagnóstico mecanístico de reações eletroquímicas, identificação de espécies presentes na solução assim como para a análise semi-quantitativa da velocidade de reação (BRETT; BRETT, 1993).

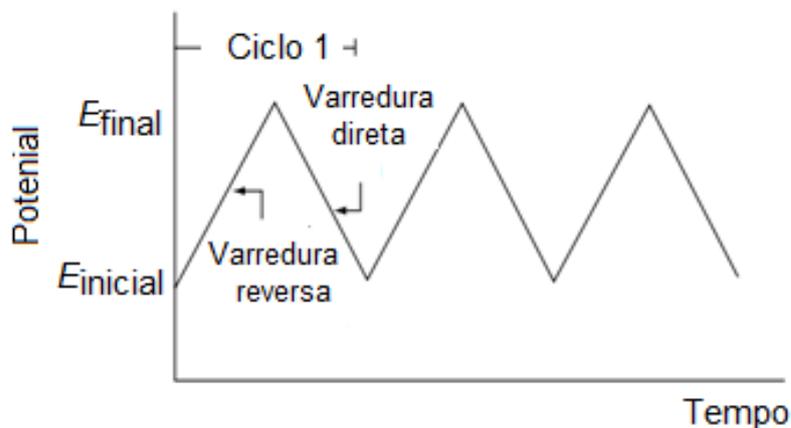
Voltametria Cíclica (VC)

Em muitos casos, a VC constitui o primeiro experimento realizado em um estudo eletroanalítico, proporcionando particularmente uma localização rápida dos potenciais redox das espécies eletroativas em análise, e avaliação conveniente do efeito dos meios no processo redox (WANG, 2006). Ela é uma técnica de inversão e é o equivalente à varredura de potencial na cronoamperometria de salto duplo de potencial (BARD; FAULKNER, 1944).

A VC tornou-se uma técnica muito popular para estudos eletroquímicos iniciais de novos sistemas e provou ser muito útil na obtenção de informações qualitativas sobre reações de eletrodo bastante complicadas (BARD; FAULKNER, 1944; WANG, 2006). O seu poder resulta de sua capacidade em fornecer rapidamente informações consideráveis sobre a termodinâmica de processos redox bem como da cinética de reações de transferência de elétrons heterogêneas em reações químicas acopladas ou processo adsorção (WANG, 2006).

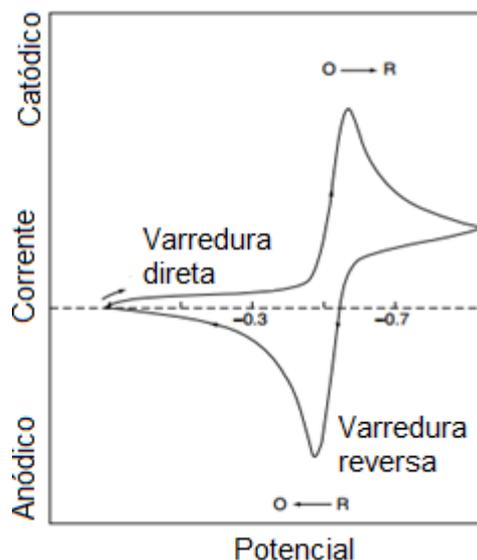
Tecnicamente, a VC consiste em varrer o potencial linearmente de um eletrodo de trabalho estacionário (em uma solução sem agitação), utilizando uma forma de onda de potencial triangular (figura 5). Dependendo da informação pedida, ciclos simples ou múltiplos podem ser utilizados. Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado (WANG, 2006).

Figura 5 - Sinal de excitação em forma de onda triangular potencial-tempo em um experimento voltamétrico cíclico.



Fonte: WANG, 2006, adaptado.

Figura 6 - Voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível $O + ne^- \rightleftharpoons R$. Esta é uma resposta esperada de um par redox reversível durante um único ciclo de potencial.



Fonte: WANG, 2006, adaptado.

A figura 6 ilustra a resposta esperada de um par redox reversível durante um único ciclo de potencial. Inicialmente, assume-se que apenas a forma oxidada, O está presente, uma varredura de potencial indo para a redução (valores negativos) é escolhida para a primeira metade do ciclo, a partir de um valor em que ocorre qualquer redução. Quando o potencial aplicado se aproxima do E° característico para o sistema redox, uma corrente de redução aparece e aumenta, até que um máximo de corrente é atingido. Atravessada a região de potencial de redução (pelo

menos $90/n$ mV para além do pico), inverte-se a direção da varredura de potencial. No scan reverso, as espécies reduzidas, R (geradas no meio, no ciclo direto, e acumuladas perto da superfície) são re-oxidadas de volta para O, resultando num pico anódico (WANG, 2006).

Uma vez que na VC, a correção para a corrente de carregamento (resultante de processos não faradáicos) é tipicamente incerta, observa-se uma imprecisão na medição de correntes de pico. Para o pico de inversão, a imprecisão é aumentada ainda mais, porque não se pode facilmente definir a resposta faradáica dobrada para o processo direto de modo a utilizar como uma referência para a medição (BARD; FAULKNER, 1944). Assim, a técnica de VC não é ideal para a avaliação quantitativa das propriedades do sistema que tem de ser derivado a partir de alturas de pico, tal como a concentração de uma espécie eletroativa ou a constante de velocidade de uma reação homogênea acoplada. O poder do método reside na sua força de diagnóstico, o qual é derivado a partir da facilidade de interpretação do comportamento qualitativo ou semi-quantitativo. Outros métodos são, muitas vezes, mais adequados para a avaliação exata dos parâmetros (BARD; FAULKNER, 1944).

Vários parâmetros importantes caracterizam o voltamograma cíclico, quatro destes observáveis, os dois picos de corrente e dois potenciais de pico, fornecem a base para o diagnóstico desenvolvido por Nicholson e Shain para analisar a resposta voltamétrica cíclica (WANG, 2006).

Em sistemas Nernstianos, a diferença entre E_{pa} e E_{pc} , geralmente simbolizada por ΔE_p é um teste de diagnóstico útil de uma reação nernstiana. Embora ΔE_p seja uma função de E_λ (potencial de comutação) esta é sempre perto de $2,3 RT/nF$ (ou $59/n$ mV a 25°C) (BARD; FAULKNER, 1944; WANG, 2006). Em sistemas reversíveis, a corrente de pico para um par reversível (a 25°C) é dada pela equação de Randles-Sevcik $i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2}$, onde n é o número de elétrons; A a área do eletrodo (em cm^2), C a concentração (em mol/dm^3), D o coeficiente de difusão (em cm^2/s) e ν a velocidade de varredura do potencial (em V/s). Assim, a corrente é diretamente proporcional à concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Tal dependência da taxa de varredura é indicativa de reação do eletrodo controlada por transporte de massa (difusão linear semi-infinita). (WANG, 2006).

Dois parâmetros medidos de interesse nas curvas $i-E$ (voltamogramas cíclicos) são a razão das correntes de pico (pico direto e reverso ou anódico e

catódico), i_{pd}/i_{pr} ou i_{pa}/i_{pc} , e a separação dos potenciais de pico, $E_{pa} - E_{pc} = \Delta E_p$. Para uma onda Nernstiana ou sistema reversível com produto estável, $i_{pa}/i_{pc} = 1$ independentemente da velocidade de varredura (BARD; FAULKNER, 1944; WANG, 2006). Assim, a separação de pico pode ser utilizada para determinar o número de elétrons transferidos, e como um critério para um comportamento Nernstiano (WANG, 2006). Por conseguinte, um processo mono-eletrônico rápido apresenta uma ΔE_p de cerca de 59 mV. Ambos os potenciais de pico catódicos e anódicos são independentes da velocidade de varredura. A 25 °C, a diferença em potencial entre o potencial na metade da altura do pico, $E_{p/2c}$ ($I = I_{pc}/2$) e o potencial do pico, E_{pc} é dada pela equação: $|E_{pc} - E_{p/2c}| = 2.2 \frac{RT}{nF} = \frac{56.6}{n} mV$ (BRETT; BRETT, 1993). Esta equação pode ser aplicada para a determinação do número de elétrons do processo envolvido.

É possível relacionar o potencial de meio-pico ($E_{p/2}$, onde a corrente é metade da corrente de pico) para o potencial de meia-onda polarográfica, $E_{1/2}$: $E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0.028}{n} V$ (o sinal é positivo para o processo de redução (WANG, 2006).

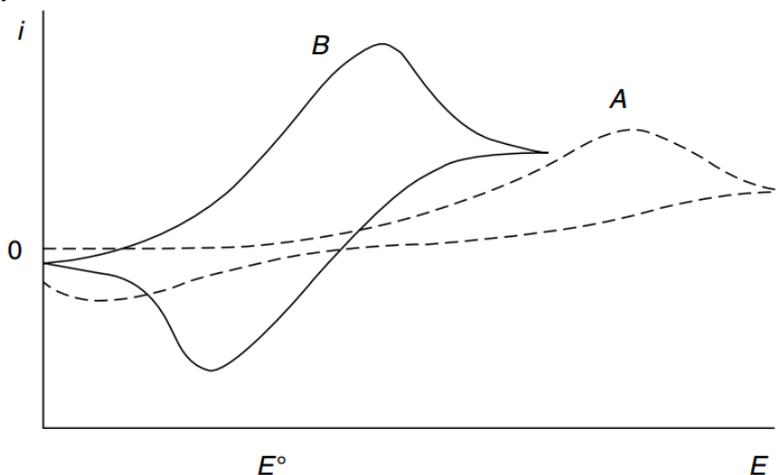
Para processos de transferência multieletrônica (reversíveis), o voltamograma cíclico consiste de vários picos distintos, se os valores E° para etapas individuais são sucessivamente mais elevados e são bem separados (WANG, 2006).

Para processos irreversíveis (aqueles com troca de elétrons lenta), os picos individuais são reduzidos em tamanho e amplamente separados (figura 7, curva A). Sistemas totalmente irreversíveis são caracterizados por uma mudança do potencial de pico com velocidade de varredura:

$$E_p = E^\circ - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln \frac{k^\circ}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right]$$

onde, α é o coeficiente de transferência e n_a é o número de elétrons envolvidos em cada etapa de transferência (WANG, 2006). O potencial de pico e o potencial de meio pico (a 25°C) serão diferentes por $48/\alpha n$ mV. Assim, o voltamograma torna-se mais inclinado, quando αn diminui. A corrente de pico, dada por $i_p = (2,69 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2}$ ainda é proporcional ao gradiente de concentração, mas será mais baixa em altura (WANG, 2006).

Figura 7 - Voltamograma cíclico para processos redox irreversível (curva A) e quase-reversível (curva B)



Fonte: Wang, 2006

Para sistemas quase-reversíveis (com $10^{-1} > k^{\circ} > 10^{-5}$ cm/s), a corrente é controlada tanto pela transferência de carga e transporte de massa. A forma do voltamograma cíclico é uma função de $K^{\circ}/\sqrt{\pi a D}$ (onde $a = nFv/RT$). À medida que $K^{\circ}/\sqrt{\pi a D}$ aumenta, o processo se aproxima do caso reversível. Para pequenos valores $K^{\circ}/\sqrt{\pi a D}$ (isto é, em v muito rápidas), o sistema exibe um comportamento irreversível. Em geral, os voltamogramas de um sistema quase-reversível são mais prolongados e apresentam uma maior separação dos picos de potenciais em comparação com um sistema reversível (figura 7, curva B).

1.1.4.2 Técnicas de salto de Potencial

a) Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

A VPD constitui uma técnica extremamente comum para determinações em níveis de traço de espécies orgânicas e inorgânicas (WANG, 2006). Nesta técnica, aplica-se no eletrodo de trabalho pulsos superpostos de igual amplitude em uma rampa linear de potencial, sendo que a corrente é amostrada duas vezes, um pouco antes da aplicação dos pulsos e no final da aplicação dos mesmos, quando a corrente da carga se tenha decomposto (SOUZA et al, 2003; WANG, 2006; VALENTE, 2010).

A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda (já que a primeira tem contribuição capacitiva enquanto a segunda é faradáica, tornando a

técnica mais sensível, pela correção eficaz da corrente de carregamento de fundo, desprezando-a - (SOUZA et al, 2003; WANG, 2006; VALENTE, 2010). A sua diferença ($\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$) é plotada contra o potencial de rampa linear aplicado e o voltamograma de VPD resultante (com a forma de uma curva gaussiana) consiste de picos de corrente em que sua altura é diretamente proporcional à concentração dos analitos correspondentes (WANG, 2006). A resposta em forma de pico de medições de pulso diferencial resulta também em melhorar a resolução entre duas espécies com potencial redox próximo. Em várias situações, picos separados por 0,05 V podem ser medidos, contrariamente à voltametria de pulso normal que requer uma diferença de potencial na ordem de 0.2V (WANG, 2006; VALENTE, 2010). Tais quantificações não só dependem dos potenciais de pico correspondentes, mas também das larguras de pico (na meia altura) que se encontram estequiometricamente relacionados pela seguinte equação: $W_{1/2} = 3.52 \frac{RT}{nF}$ (BRETT; BRETT, 1993; BARD; BARD; FAULKNER, 1944; WANG, 2006). Devido à minimização da corrente de carregamento de fundo, a VPD torna-se uma técnica de sensibilidade apreciável, permitindo medições em concentrações tão baixas quanto $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (cerca de 1 μL) (WANG, 2006; VALENTE, 2010).

b) Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

A voltametria de onda quadrada (VOQ), do inglês “Square Wave Voltammetry (SWV)”, constitui uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Seus limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). A sensibilidade desta técnica é maior em relação a outras técnicas, particularmente para sistemas reversíveis e quase-reversíveis, dado que a corrente de pico é a soma das contribuições da direta e da reversa, e é proporcional à velocidade de varredura (BORMAN, 1982).

Tal como foi visto para a VPD, usando voltametria de onda quadrada, é possível determinar o número de elétrons trocados por uma análise matemática de

pico da VOQ, onde a meia largura do pico ($W_{1/2}$) está correlacionada com o número de elétrons trocados pela seguinte relação (Ramalay; Kraus, *apud* OATAO, 2011).

$$W_{1/2} = 3.52 \frac{RT}{nF}$$

Um dos parâmetros importantes por se analisar na SWV é a frequência com que são aplicados os pulsos, pois, para além de ser usada para questões de diagnóstico do mecanismo eletródico, a frequência é fundamental tanto na melhoria da sensibilidade da análise, quanto na determinação do número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica (CABRAL et al, 2003).

Para um processo de oxirredução reversível, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da frequência. Já, para um processo irreversível, a corrente varia linearmente com a frequência, e para um processo quase-reversível, a corrente de pico aumenta, porém não possui nenhuma relação linear com a frequência (PUC-Rio – Certificação Digital N° 0212140/CA).

Para reações reversíveis, o potencial de pico apresenta uma relação linear com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, apresentando uma inclinação de: $\Delta E/\Delta \log(f) = -2,3RT/2nF$ (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

1.1.5 Eletroquímica do Metronidazol e seus derivados

Diversas técnicas eletroquímicas, principalmente as voltamétricas têm sido usadas intensamente na investigação dos compostos da série dos nitroimidazóis quer em termos analíticos, quer em formulações farmacêuticas, tanto quanto na determinação do grau de sua interatividade com biomoléculas, uma vez que os potenciais redox revelam grande importância para a compreensão da sua atividade biológica (BARETY et al, 1984). Assim, as propriedades redox são o cerne para sua atividade, seletividade e mecanismo de resistência das bactérias (CAVALCANTI et al, 2004), sendo que os potenciais de redução dos NHs fornecem informações quanto à possibilidade de transferência de um elétron in vivo.

A facilidade de redução de um fármaco é um fator importante para a reatividade e, para alguns fármacos quimicamente relacionadas com as estruturas químicas de NHs ou precursores foi descrita uma correlação entre os potenciais de redução e a eficácia farmacológica ou de toxicidade (LIVERTOUX; LAGRANGE; MINN, 1996).

O modo de ação do MTZ é bem estabelecido em organismos anaeróbios. Tal como outros 5-nitroimidazóis, sua ativação ocorre por meio de redução enzimática (SCARPIGNATO, 2004; LEITSCH, 2011), eliminando assim agentes patogênicos susceptíveis. Esta propriedade torna-o eficaz contra microrganismos de baixo estado redox intracelular, tais como as bactérias anaeróbias e protozoárias, bem como alguns microaerófilos⁶, como *Campylobacter spp.* e *Helicobacter pylori* (KAAKOUSH; MENDZ, 2005). O potencial redox do MTZ é mais negativo do que os sistemas redox presentes em células de mamíferos, o que se acredita ser a base para a sua especificidade elevada e baixa toxicidade (VALDEZ et al, 2009; MORETH et al, 2010).

O MTZ entra nas células via difusão, porém, devido ao seu baixo potencial redox (potencial redox muito negativo), a formação de metabólitos reduzidos é limitada às células que tenham doadores eletrônicos com um potencial redox suficientemente negativo e um potencial redox intracelular satisfatório (JORGENSEN et al, 1998; KAAKOUSH; MENDZ, 2005).

Estudos de ressonância de spin eletrônico e bioquímicos em *Trichomonas vaginalis* e *Trichomonas feto* revelaram que piruvato: ferredoxina oxidoredutase (PFOR) e, em menor medida hidrogenase, reduzem ferredoxina (Fd) que por sua vez pode ser oxidada por MTZ (TOWNSON et al 1994; HRDÝ et al, 2005). Em *G. lamblia*, *T. vaginalis* e *E. histolytica*, a ativação (estado tóxico radicalar) foi proposta para ocorrer via redução por par eletrônico de baixo potencial, PFOR e Fd (figura 8) (MÜLLER 1983; EDWARDS, 1993; TOWNSON, UPCROFT; UPCROFT, 1996). Neste processo, a Fd é em si reduzida pela enzima chave metabólica, PFOR em *Giardia* (VALDEZ, et al, 2009). Esta proposta foi recentemente desafiada por trabalhos de Leitsch e colaboradores (2009), pois, estes revelam que a redução do MTZ nos anaeróbios *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* é via flavina (FAD) e NADPH redutase, dependente da tiorredoxina redutase (TrxR), que age diretamente sobre o MTZ como uma nitroredutase (LEITSCH, 2011) (figura 9).

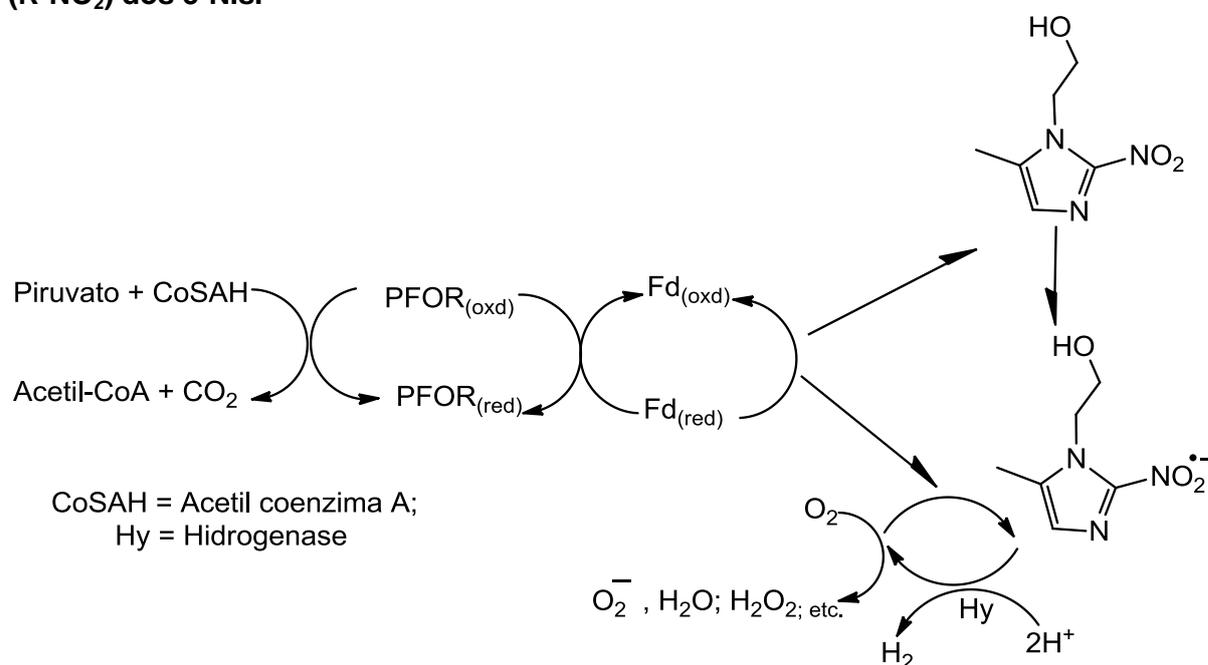
Em ensaios sem células, mas contendo piruvato e cofator acetil coenzima A (CoASH), a PFOR purificada a partir da *Giardia* juntamente com Fd foi capaz de reduzir o MTZ (TOWNSON; UPCROFT; UPCROFT, 1996). Julga-se que durante esse processo, a PFOR purificada doa elétrons para a ferredoxina da *Giardia* (Fd I)

⁶ Organismos que crescem em meios com quantidade de oxigênio muito pequena e em meios com quantidades de oxigênio normais não conseguem crescer.

com concomitante redução do MTZ, observando-se uma diminuição da absorvância a 320 nm que pode ser usada para seguir a redução do MTZ, e sob condições ideais a redução é completa (TOWNSON, 1994).

Esta informação tem dado crédito à ideia iniciada por Edwards (1993) segundo a qual o par PFOR/Fd é o único com um baixo potencial redox capaz de reduzir o MTZ em microrganismos anaeróbios, enquanto os aeróbios são incapazes de reduzir o MTZ, porque não possuem um par redox com um potencial redox baixo suficiente (LEITSCH et al, 2011). Não obstante, relativamente pouco se sabe quanto à eletroquímica de muitos 5-NIs, dificultando assim tecer conclusões pormenorizadas referentes à importância do baixo potencial redox para a sua atividade antimicrobiana, seletividade e mecanismos de ação (UPCROFT; UPCROFT; 2001; VALDEZ et al, 2009).

Figura 8 - Redução de compostos 5-Nitroimidazois (5-NIs) a partir do par PFOR/Fd. A redução ocorre em anaeróbios como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*. Durante descarboxilação oxidativa do piruvato, a ferredoxina (Fd) é em si reduzida pela enzima piruvato: ferredoxina oxidoredutase (PFOR), ao receber elétrons dela, sendo que depois doa um (1) elétron que reduz o grupo nitro (R-NO₂) dos 5-NIs.

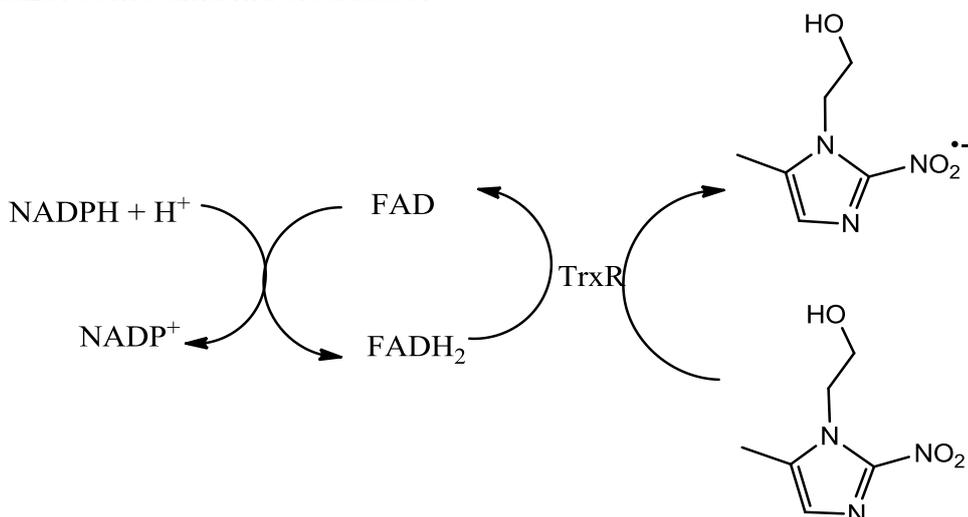


Fonte: Modificado de LEITSCH, et al 2011; JOHNSON, 1993.

Conforme a figura 8, os elétrons liberados na oxidação do piruvato são transferidos à ferredoxina (reduzindo-se) ou flavodoxina, donde podem ser capturados pelo MTZ que se reduz formando o ânion radical nitro (intermediário com

curto tempo de vida) e outros compostos produzidos, inclusive os derivados nitrosos e hidroxilamínicos, podem reagir com o DNA (dos micróbios alvo, mas não as células de mamíferos (VALDEZ et al 2009), causando quebra das ligações e rápida morte subsequente (CAVALCANTI et al, 2004; OLIVEIRA, 2004). Bactérias anaeróbias e protozoários desenvolvem resistência ao MTZ, ao reduzir ou abolir a atividade de componentes desta série de reações de transporte eletrônico, resultando em uma taxa insuficiente de acumulação de metabólitos reduzidos (JORGENSEIN et al, 1998).

Figura 9 - Proposta recente para a redução do MTZ em anaeróbios *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*. Esta redução ocorre via flavina (FAD) e (NADPH)-redutase, dependente da tiorredoxina redutase (TrxR), que age diretamente sobre metronidazol como uma nitroredutase.

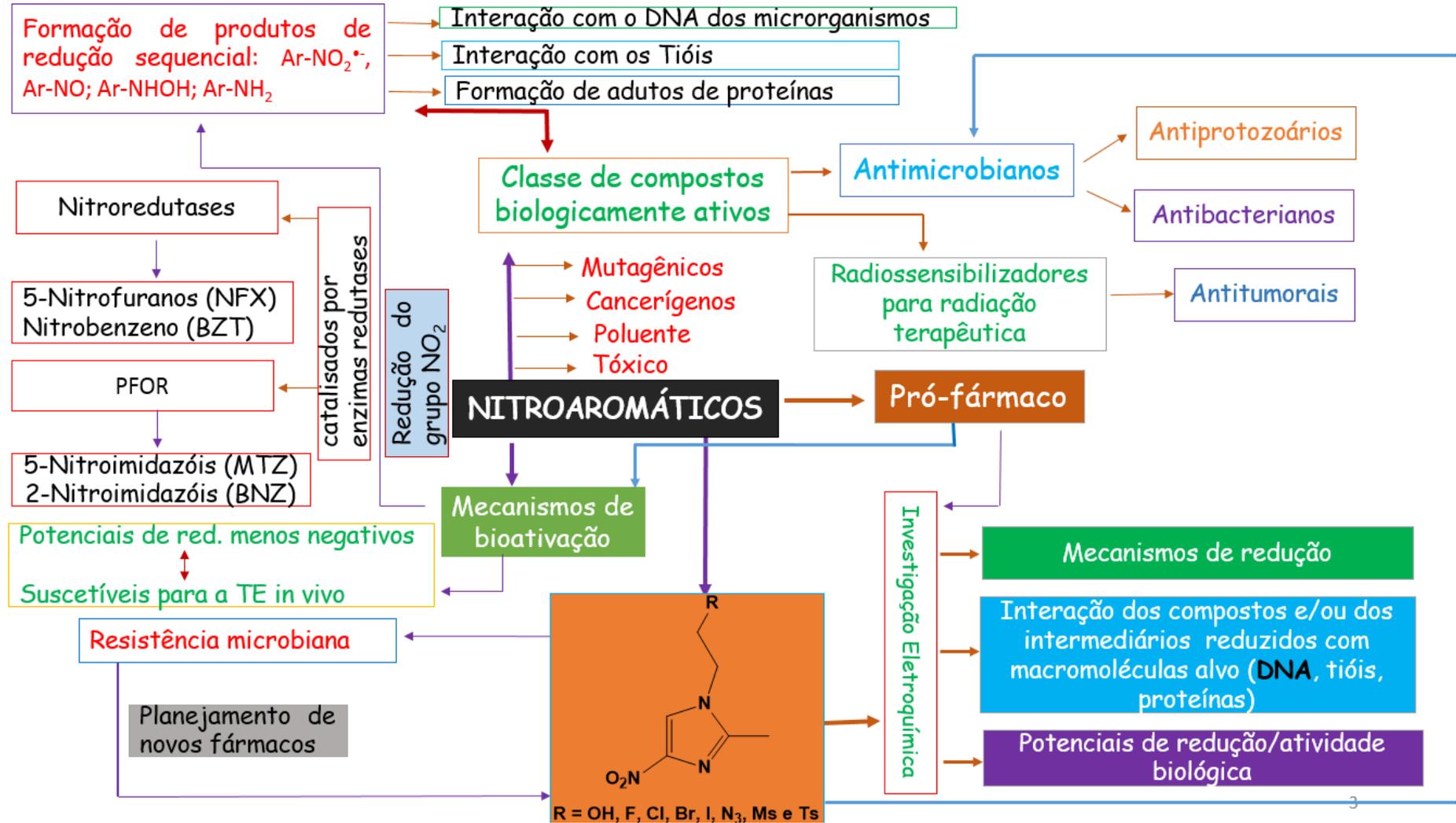


Fonte: Modificado de LEITSCH, et al, 2011

Estudo eletroquímico em ECV (d = 3 mm) dos derivados Br-MTZ e I-MTZ revelou potencial de redução menos catódico em relação ao padrão MTZ (CAVALCANTI et al, 2004). Estes resultados destacam o potencial de redução dos compostos como uma propriedade eletroquímica relevante para a atividade giardicida destes compostos (BUSATTI et al, 2013). A respeito do derivado fluorado (F-MTZ) não se encontram relatados na literatura informações sobre as propriedades redox concernentes à sua atividade, seletividade, sensibilidade biorredutiva, bem como seu mecanismo de redução eletródico.

A figura 10 descreve resumidamente a atuação dos nitroaromáticos, sua dualidade funcional, mecanismos de bioativação, bem como as macromoléculas alvos com as quais interagem os intermediários reduzidos dos nitroaromáticos.

Figura 10 - Esquema resumido da atuação dos nitrocompostos



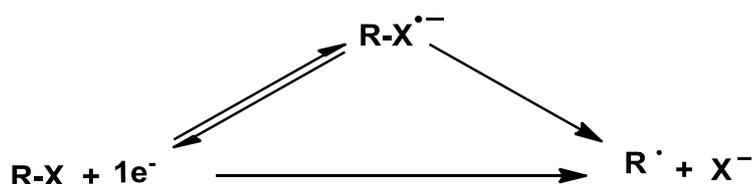
1.1.7 Processo de grafting

No campo da eletroquímica, o carbono vítreo é considerado por muitos eletroquímicos um material eletródico “inerte” (há décadas atrás), universal e barato com larga janela de potencial, tanto catódica, quanto anódica, para a execução de análises (POIZOT et al, 2012; LORCY et al, 2013). No entanto, para os substratos de carbono vítreo desenvolvidos atualmente é importante reconsiderar a sua reatividade específica em adicionar radicais livres covalentemente na sua superfície, gerados química ou eletroquimicamente (MORITA et al, 2011; POIZOT et al, 2012).

Embora seja um assunto de controvérsia, o carbono por apresentar uma estrutura bastante complexa é julgado um material que não sofre o processo de grafting. Atualmente há uma tendência de se aceitar que os carbonos vítreos, nos seus diferentes designs ou configurações dependendo da forma de síntese, apresentam ligações duplas entre os átomos de carbono provavelmente organizados em agrupamentos/fitas sp^2 como folhas de grafite intercaladas com outras regiões de carbono amorfo ou em microestruturas relacionadas com fluoreno (POIZOT et al, 2012; LORCY et al, 2013) e a adição de radicais arila e alquila na superfície de carbono vítreo leva a (re)considerar que esta superfície está embebida por compósitos nanoparticuladas que mantém sua reatividade química, como a grafite e os fluorenos (SIMONE, 2013).

O processo de grafting está relacionado com o mecanismo de transferência eletrônica dissociativa. Neste mecanismo, os sistemas químicos estão susceptíveis a sofrer quebra da ligação sigma (MARAN; WORKENTIN, 2002), que segue o esquema da figura 11.

Figura 11 - Mecanismo hipotético de transferência de elétrons dissociativa



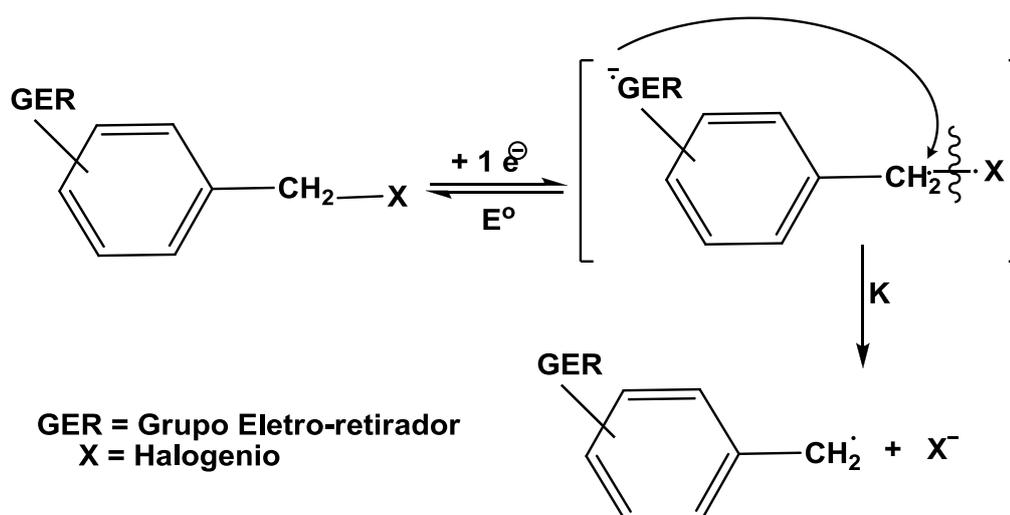
Fonte: MARAN; WORKENTIN, 2002.

Estudos eletroquímicos recentes relatam quebras redutivas de halogenetos orgânicos, por exemplo, os alquílicos, os brometos benzílicos, 9-bromofluorenos,

haloacetone nitrilas de chumbo, etc.. Tal comportamento conduz à quebra eletroquímica que leva à formação de radicais livres capazes de enxertarem ou ancorarem-se na superfície do grafite ou carbono vítreo (POIZOT et al, 2012; LORCY et al, 2013). Este processo de grafting pode ser levado a cabo por radicais livres (por exemplo, iodetos alílicos primários) na faixa de potencial onde estejam eletroquimicamente estáveis (entre -1,6 V e -1,0 V) e a reatividade do carbono vítreo pode ser percebida sob polarização catódica na faixa de potencial (E) < -1,7 vs. Ag/AgCl, isto é, em potenciais significativamente catódicos, onde se sugere a formação de espécies nucleofílicas capazes de produzir em ampla faixa reações interfaciais (LORCY et al, 2013).

Certos haletos insaturados ou aromáticos contendo grupos eletroatraentes sofrem facilmente reações de redução. O mecanismo envolvido nessas reações de transferência de elétrons (ilustração na figura 12), leva a uma adição inicial de elétrons ao sistema pi (π) no grupo eletroatraente, formando-se o ânion radical que seguidamente promove uma transferência eletrônica intramolecular ao sistema sigma (σ) R-X (por exemplo, aril-núcleo do átomo a abandonar) por interação de orbitais, levando a uma quebra da ligação C-X e conseqüente desalogenação (ÁLVAREZ-GRIERA; GALLARDO; GUIRADO, 2009).

Figura 12 - Mecanismo de transferência de elétrons do sistema pi do grupo eletroatraente ao sistema sigma ortogonal C-X e conseqüente quebra.



Fonte: ÁLVAREZ-GRIERA; GALLARDO; GUIRADO, 2009; adaptado

1.1.8 Biossensor de DNA

O desenvolvimento de biossensores têm impactado uma grande variedade de áreas de interesse científico e tecnológico, como por exemplo no campo da medicina ou saúde, análise de alimentos, defesa/aplicações ambientais (RADKE; ALOCILJA, 2005; KRÖGER; LAW, 2005; WANG, 2006; De OLIVEIRA; COSTA; Da FONSECA, 2006; TUDORACHE; BALA, 2007; MASCINI; TOMBELLI, 2008, GASTER et al, 2009, SHARMA et al, 2013), investigações forenses (WANG 1998; REDSHAW 2007; SINGH et al, 2014, RADKE; ALOCILJA, 2005).

A aplicação da biotecnologia em medicina tem sido relevante nos últimos tempos, pois, ela pode levar à descoberta de novas formas de diagnosticar, tratar e prevenir uma variedade de doenças. Técnicas desenvolvidas como anticorpos monoclonais, biossensores, sondas de DNA, chips de DNA, etc., constituem ferramentas úteis com possibilidades de serem usadas no diagnóstico (De OLIVEIRA; COSTA; Da FONSECA, 2006). No campo da Biotecnologia destaca-se o uso de biossensores eletroquímicos.

Um biossensor é um dispositivo de análise que combina a especificidade de um elemento sensor biológico com um transdutor para produzir um sinal elétrico, ótico proporcional à concentração do analito alvo (IUNI-IUI; HONG; RUIFU, 1997; DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005; WANG, 2006).

Os biossensores eletroquímicos combinam o poder analítico de métodos eletroquímicos com a especificidade do processo de reconhecimento biológico (PALEČEK et al, 1998). Eles são classificados em amperométricos, condutimétricos e potenciométricos (De OLIVEIRA; COSTA; Da FONSECA, 2006), desenvolvidos com o intuito de diagnosticar as diversas doenças.

Uma das biomoléculas mais importantes é sem dúvida o ácido desoxirribonucléico (DNA). Ele desempenha um papel fundamental no processo vital. É responsável pela informação hereditária, coordena a síntese biológica de proteínas e enzimas através de processos de transcrição e replicação da informação genética em células vivas (RAUF et al, 2005). Esta capacidade é garantida pela manutenção específica das suas bases purinas (guanina e adenina) e pirimidinas (citosina e timina) (BRETT, 2004). Watson e Crick foram os primeiros cientistas a formular uma descrição exata da estrutura helicoidal complexa da molécula de DNA (PRAY, 2008), Nessa descrição, as duas cadeias de DNA são mantidas juntas

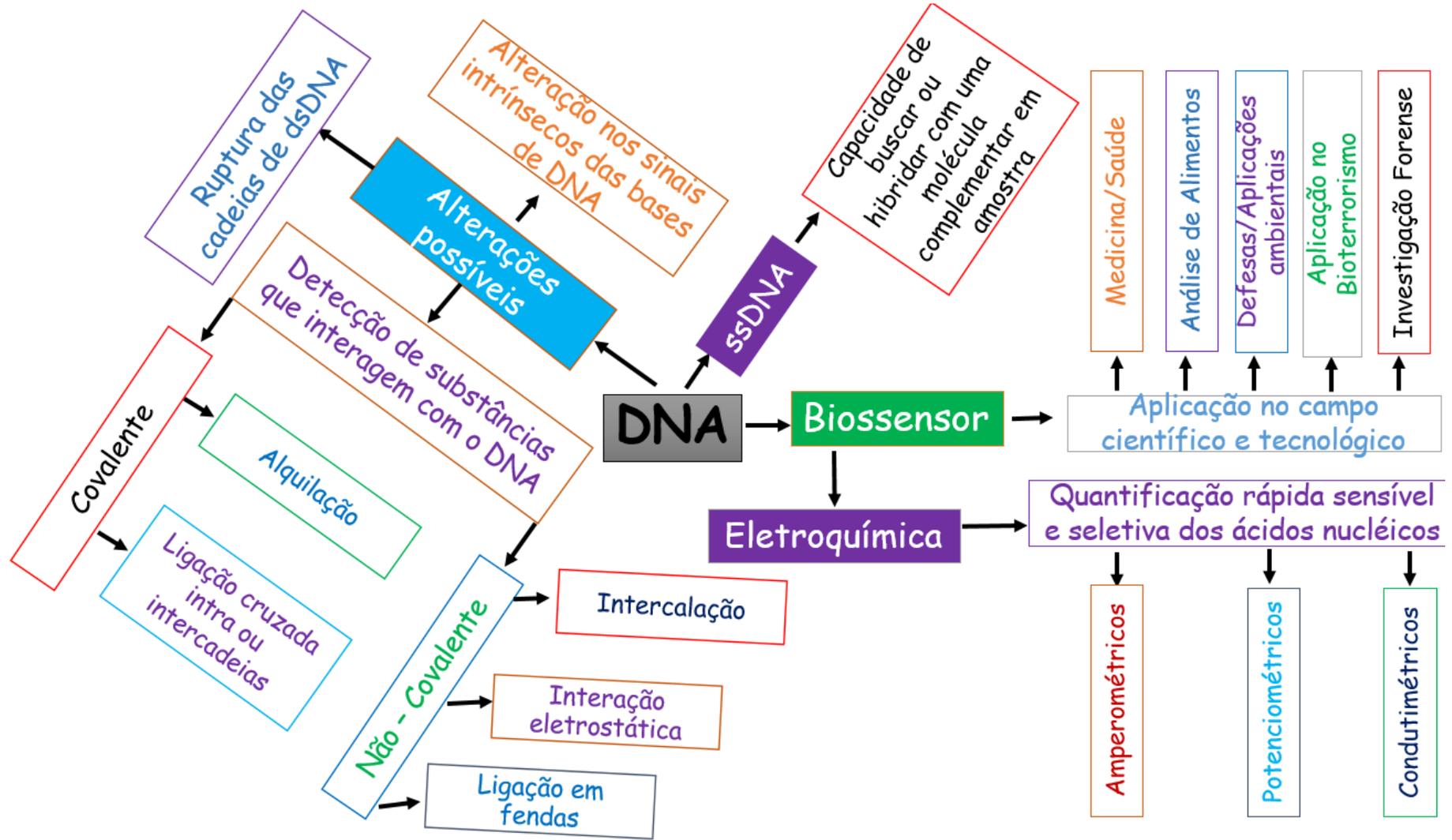
principalmente por ligações de hidrogénio, onde a adenina (A) forma duas ligações de hidrogénio com a timina (T) enquanto a citosina (C) forma três ligações de hidrogénio com a guanina (G) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Sob diversas condições as moléculas de DNA são propensas a vários danos, fundamentalmente ao interagirem com algumas moléculas levando a alteração na sequência específica das bases o que provoca perturbações moleculares para a maquinaria genética, que levam ao mau funcionamento da célula e alterações patológicas nos organismos vivos (BRETT, 2004; YOLA; ÖZALTIN, 2011). Os radicais livres e exposição à radiação ionizante provoca danos oxidativos ao DNA gerando vários produtos na estrutura da dupla hélice tais como 8-oxoguanine, 2,8-oxoadenine, etc., que são mutagênicos (BRETT, 2004).

A molécula de DNA é o alvo biológico de muitos fármacos que atualmente encontram-se em uso clínico ou em ensaios clínicos avançados (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). O interesse na concepção da ligação do DNA com pequenas moléculas para o planejamento e construção de novos fármacos, mais eficientes e mais direcionadas ao DNA tem crescido muito atualmente (YOLA; ÖZALTIN, 2011; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

O interesse em investigação eletroquímica da interação entre o fármaco e o DNA também tem ascendido (KALANUR; KATRAHALLI; SEETHARAMAPPA, 2009), e, os eletrodos sólidos à base de biossensores de DNA têm demonstrado grande utilidade para se obter uma quantificação rápida, sensível e seletiva de ácidos nucléicos (PEDANO; RIVA, 2003). Os eletrodos de mercúrio ou de carbono, tanto no modo convencional voltamétrico ou como biossensores eletroquímicos baseados em DNA, têm sido utilizados nos estudos das modificações mais sutis no DNA resultantes de danos no DNA e/ou as interações de DNA com potenciais agentes prejudiciais do mesmo, por exemplo, cancerígenos ou fármacos anti-cancerígenos. A figura 13 apresenta um breve resumo de muitos processos descritos na literatura relacionados ao DNA.

Figura 13 - Esquema resumo dos processos envolvendo o DNA.



Fonte: Autor, 2015

A interação do DNA com certos fármacos, entre eles, os citostáticos⁷ pode levar à formação de adutos covalentes de DNA com sinais eletroquímicos característicos. Alguns destes sinais foram observados após interação do DNA com mitomicina C (um fármaco anticancer que interage diretamente com resíduos da guanina formando adutos covalentes após ativação redutiva química induzida ou ácida na superfície do eletrodo gotejante de mercúrio (HMDE)), onde ocorre um decréscimo no pico da corrente (PALEČEK et al, 1998). Wang e seus colaboradores (1997) verificaram um aumento na onda de pico de oxidação da guanina após interação do fármaco daunomicina em baixas concentrações na superfície confinada de DNA, sugerindo deformação ou flexão da dupla hélice de DNA.

Brabec e Koudelka, utilizando a voltametria de pulso diferencial e de varredura linear estudaram o comportamento eletroquímico de DNA em eletrodos de carbono e divulgaram que as correntes de oxidação são maiores para as moléculas de DNA menores, sendo que os componentes de baixo peso molecular de DNA presentes em amostras de DNA podem influenciar a eletroxidação do DNA (PEDANO; RIVA, 2003). Brett e colaboradores relataram a utilização bem sucedida de carbono vítreo como um substrato para a preparação de eletrodos modificados de DNA com capacidade de avaliar o comportamento voltamétrico de nitroimidazóis (PEDANO; RIVA, 2003).

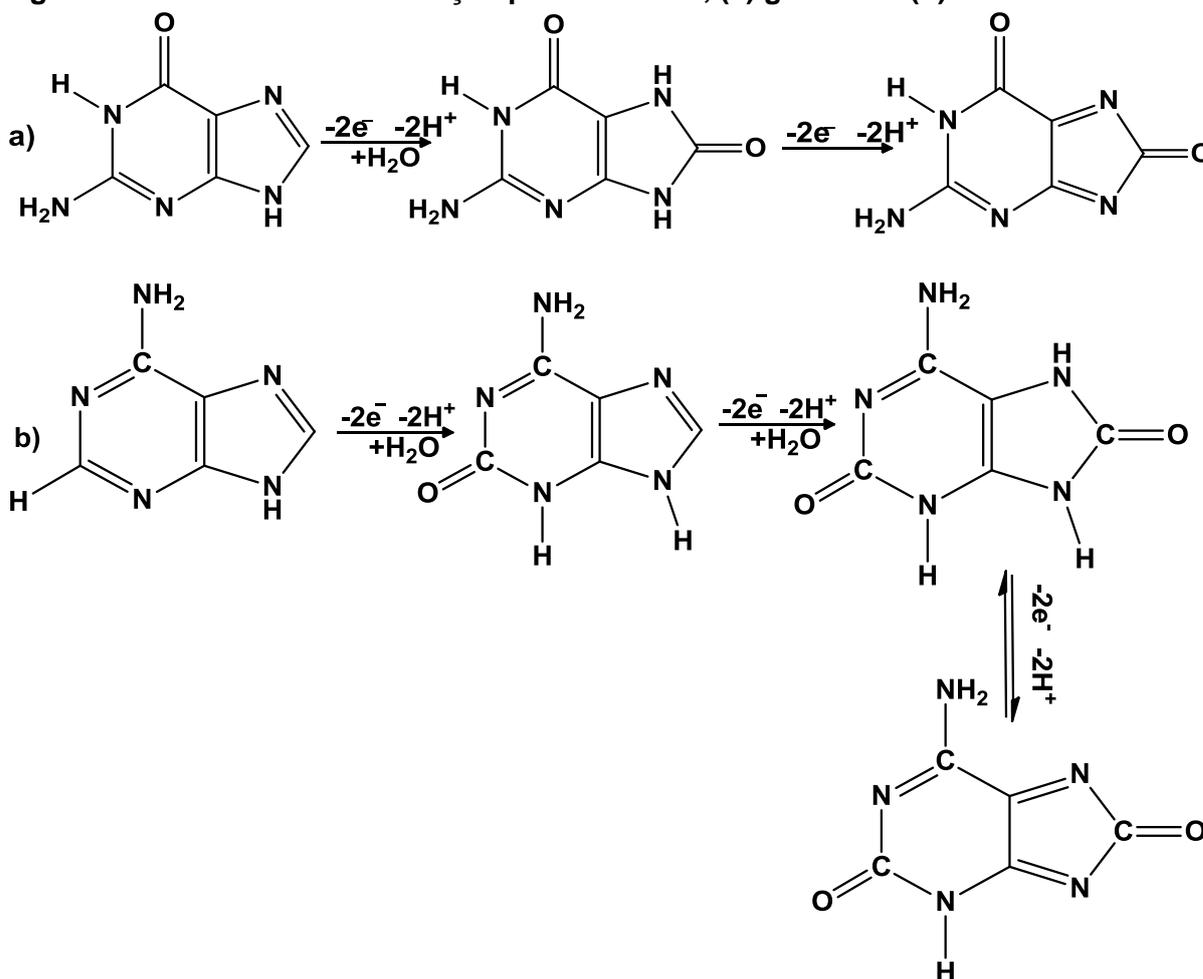
Existem várias possibilidades pelas quais moléculas pequenas ou fármacos podem seletivamente se ligar ao DNA, destacando-se a intercalação; ligação em fendas maiores e/ou menores; alquilação, etc. (PINDUR; JANSEN; LEMSTER, 2005). Na intercalação, a substância é inserida entre os pares (fitas) do DNA, ocorrendo simultaneamente o desenrolamento e alongamento da dupla hélice enquanto a ligação em fendas ocorre covalentemente ou por interações eletrostáticas sem perturbar a estrutura dupla de DNA em grande extensão (De ABREU, 2008).

Utilizando biossensor de DNA é possível investigar o mecanismo de redução de nitroimidazóis. A partir do DNA imobilizado sobre a superfície de eletrodo se estudou a redução e oxidação com formação sequencial de hidroxilamina, derivado nitroso; reação de condensação desses derivados para formar azoxi-compostos assim como sua interação com o DNA (DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005).

⁷ Os citostáticos são genotóxicos e não completamente seletivos para as células neoplásicas, podendo afetar o genoma das células normais [SUSPIRO & PRISTA, 2012]

Genericamente, dos trabalhos realizados pelos eletroquímicos sobre reações eletroquímicas dos ácidos nucleicos, apenas as bases guanina (G) e adenina (D) mostraram sofrer oxidação na superfície do eletrodo, cujo mecanismo segue dois passos envolvendo a perda total de quatro elétrons e quatro prótons para a guanina e seis elétrons e seis prótons para a adenina (figura 14) (WANG; LIU; DONG, 2001).

Figura 14 - Mecanismo de oxidação para as bases, (a) guanina e (b) adenina



Fonte: WANG, LIU & DONG, 2001.

Muitos compostos ligam-se e interagem com o DNA provocando mudanças na estrutura e/ou na sequência de bases. As ligações de hidrogênio que mantêm as fitas do DNA unidas podem ser rompidas ao interagir com um analito (fármaco, pró-fármaco ou intermediário gerado in situ), o que resultará na fissura do dsDNA expondo as bases constituintes. Os métodos voltamétricos podem ser usados para

monitorar a oxidação das bases expostas, avaliando-se assim a alteração causada no DNA (De ABREU, 2008).

Disculesceu e colaboradores (2005) investigaram por VPD, in situ, a perturbação causada pela quercetina oxidada à estrutura da dupla hélice de DNA, tendo observado que esta (nas suas formas radicalares) causa modificação na conformação do dsDNA, expondo as bases, e com visualização dos picos de oxidação da guanina em $E_{pa} = + 1,02 \text{ V}$ e adenina em $E_{pa} = +1,28 \text{ V}$.

A partir de técnicas eletroquímicas assim como as espectroscópicas pode-se estudar a interação de alguns nitrocompostos com a molécula de DNA. Alguns exemplos mostrando essa interatividade estão na tabela 4.

Tabela 4 - Sensores eletroquímicos de DNA empregados para a análise de interação com diferentes nitrocompostos (continua).

Sensor de DNA	MD	Eletrodo	Interações	Compostos	pH/meio de estudo e/ou Constante de ligação ($L mol^{-1}$)	Referência	Observações
<i>dsDNA</i> /(Fe (4 -TMPyP))	VC	ECV	Redução electrocatalítica	Ácido p-nitrobenzóico	Soluções ácidas fortes, fracas e neutras	CHEN; CHEN, 2003	Investigar a eletroquímica de Fe(2-TMPyP), and Fe(4-TMPyP) a partir da interação com eletrodos modificados com <i>dsDNA</i> e verificar a atividade electrocatalítica de <i>dsDNA</i> /(Fe (4 -TMPyP)) na redução do ácido p-nitrobenzóico e p-nitrofenol
<i>dsDNA</i> /(Fe (2 -TMPyP))	VC	ECV	Redução electrocatalítica	p-Nitrofenol	Soluções ácidas e básicas	CHEN; CHEN, 2003	
<i>dsDNA</i>	VC	ECV	Intercalação	Dibutil-estanho (IV) bis (4-nitrofenil etanoato)	10% de DMSO aquoso com 0,1 M TBAFB/ $3.25 \cdot 10^3$	SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013	Compreender o tipo de interação de <i>dsDNA</i> com fármacos que são potencialmente de interesse farmacêutico, bem como determinação de k.
<i>dsDNA</i>	E-UV-Vis	---	Por intercalação	N'-(2-hidroxibenzilideno hidrazida fórmica	---	SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013	
<i>dsDNA</i>	E-UV-Vis	----	---	4-Nitrofenilferroceno	Solução ligeiramente ácida	SIRAJUDDIN; ALI;BADSHAH, 2013	
<i>dsDNA</i>	VC, VPD e E-UV-Vis	HMDE	Por intercalação	Nitrofurantoína {1-(amino-hidantoin 5-nitro-2-furfurilideno}	Solução neutra/ $8,22 (\pm 0,05) \times 10^6$	YOLA; ÖZALTIN, 2011	Detectar a interação de nitrofuratoína a partir do comportamento eletroquímico em HMDE, particularmente as mudanças espectroscópicas (tipo de interação)
<i>dsDNA</i>	VC	ECV	Por intercalação	1-Nitro-4- (3- (4-nitrofenoxi) propoxi) benzeno, N3	Solução moderadamente ácida / 3.3×10^4	JANJUA et al, 2014	Perceber a interação de bisnitrocompostos semelhantes, mas com diferentes separadores $-CH_2-$ com o DNA. A força da interação depende do comprimento do grupo separador $-CH_2-$
<i>dsDNA</i>	VC	ECV	Por intercalação	1-Nitro-4- (4- (4-nitrofenoxi) butoxi) benzeno, N4	Solução moderadamente ácida / 5.1×10^4		

Tabela 4 - Sensores eletroquímicos de DNA empregados para a análise de interação com diferentes nitrocompostos (conclusão)

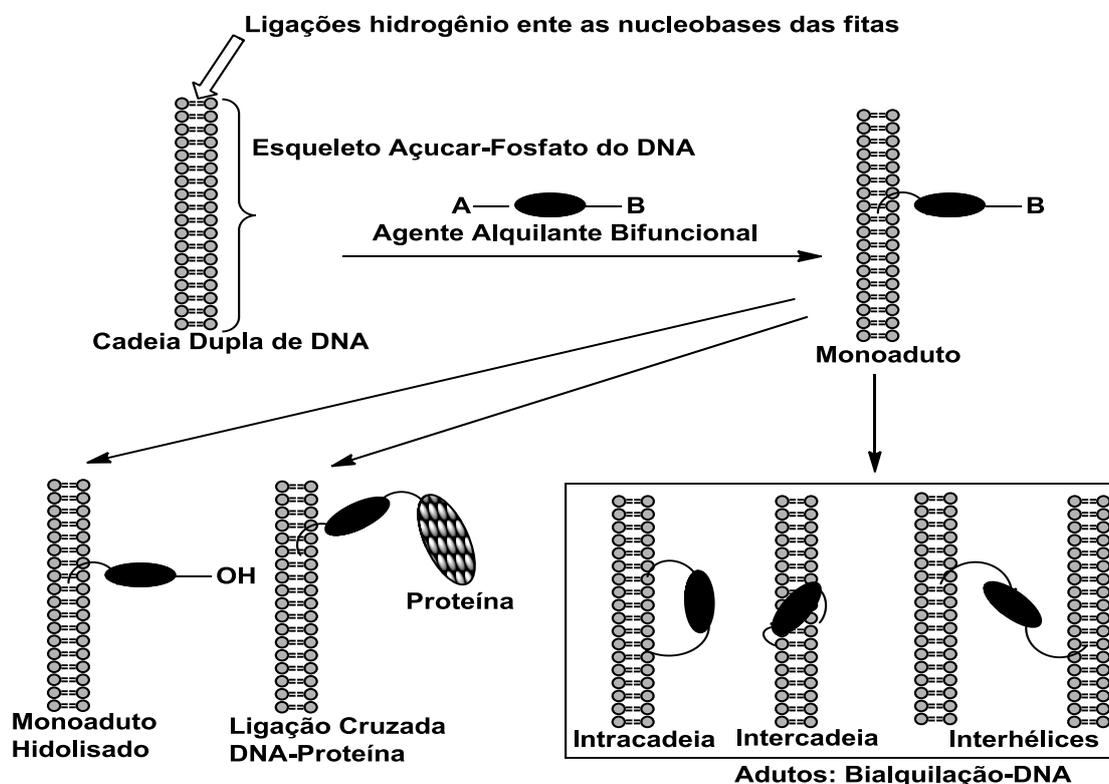
<i>dsDNA</i>	VC	ECV	Por intercalação	1-Nitro-4- (5- (4-nitrofenoxi) pentiloxi) benzeno, N5	Solução moderadamente ácida/ 7.3×10^4	JANJUA et al, 2014	
<i>dsDNA</i>	VC	ECV	Por intercalação	1-Nitro-4- (6- (4-nitrofenoxi) hexiloxi) benzeno, N6	Solução moderadamente ácida/ 1.0×10^5		
<i>dsDNA</i>	VPD	ECV		Niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitro salicilanilida)	Solução moderadamente ácida	ABREU; GOULART; BRETT, 2002	Usa biossensor eletroquímico de DNA para detectar a alteração causada ao DNA pela niclosamida

*MD = método de detecção; VPD = Voltametria de Pulso Diferencial; VC = voltametria cíclica; E-UV-Vis = espectroscopia no ultravioleta e visível; HMDE = eletrodo gotejante de mercúrio; (Fe (n -TMPyP)) = porfirinas de ferro solúveis em água (n = 2 e 4);

Fonte: Autor, 2015.

O primeiro passo necessário para a atividade cancerígena e mutagênica de agentes cancerígenos genotóxicos presume-se ser a sua interação com o DNA, quer diretamente quer após ativação metabólica. Seguindo a teoria de Miller, os sítios que potencialmente poderiam interagir com espécies eletrofílicas são os cernes nucleofílicos de DNA, especificamente: nitrogênios e oxigênios de bases de pirimidina e purina bem como o suporte principal fosfodiéster (BENIGNI; BOSSA, 2011). Conforme representado na figura 15, para além da formação de adutos a partir de um sítio específico nas nucleobases de DNA e RNA, pode ocorrer alquilação ou interação com agentes bifuncionais a partir de um único ou dois sítios da mesma nucleobase, formando um sistema monociclo, bicíclico ou tricíclico. Com uma nucleobase diferente na mesma cadeia de DNA, forma-se uma ligação cruzada intra-cadeia ou uma ligação cruzada intercadeia quando a cadeia for oposta, e ainda, na presença de uma proteína, formam-se ligações cruzadas Proteína-DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011; De ABREU et al, 2002).

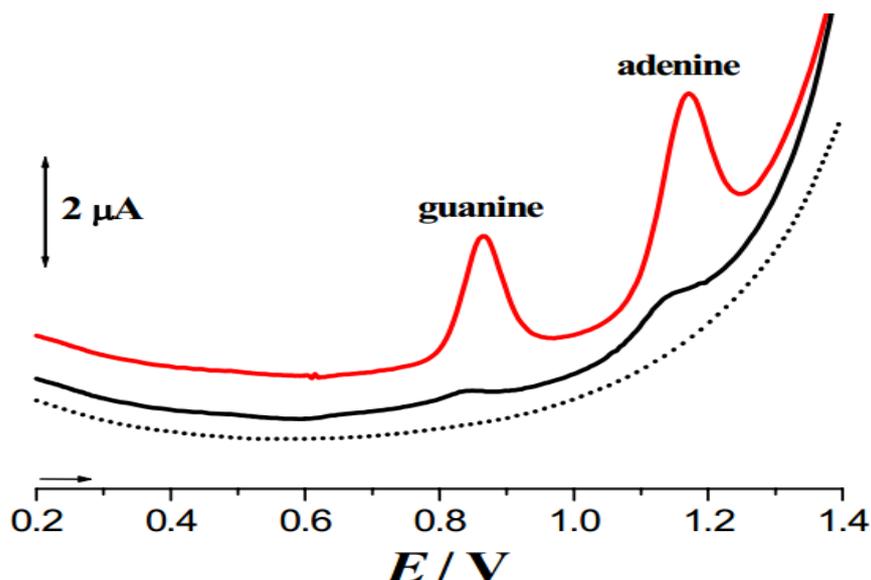
Figura 15 - Mecanismo sugestivo da interação do DNA com agentes alquilantes bifuncionais com extremidades eletrofílicas (A e B)



Fonte: De Abreu et al, 2002, adaptado.

Por voltametria de pulso diferencial verifica-se dois picos de corrente na superfície de carbono vítreo como resultado da oxidação eletroquímica do DNA (resíduos de guanina e adenina), figura 16.

Figura 16 - voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), tampão acetato (0,1 M), pH 4,5: voltamograma de linha vermelha, ssDNA (1°); linha preta cheia, dsDNA (1°) e linha preta pontilhada dsDNA (40°).



Fonte: DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005, adaptado.

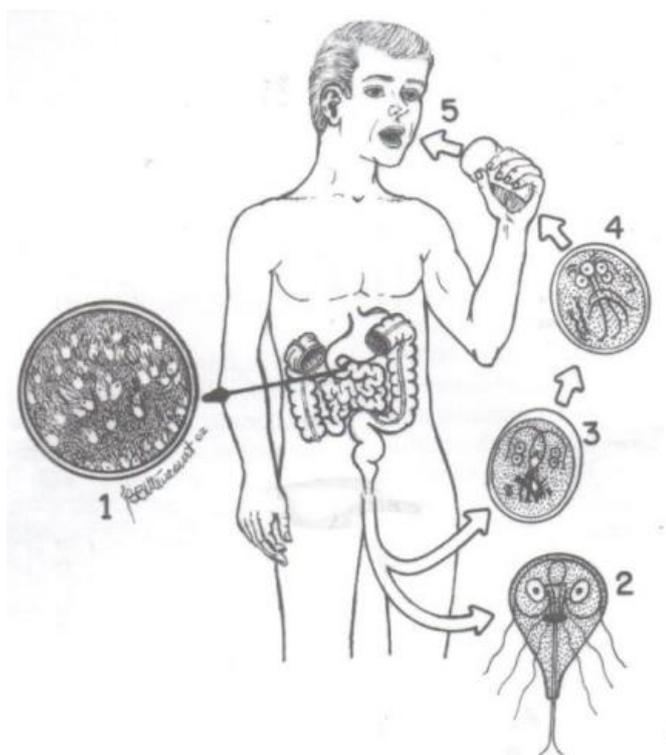
Analisando os voltamogramas de oxidação das fitas dupla (dsDNA) e simples (ssDNA) nota-se um comportamento diferenciado quanto à intensidade dos picos de corrente formados. Para os picos das bases no dsDNA, a corrente é muito menor em relação à das bases do ssDNA, ilustrando uma dificuldade significativa quanto à transferência de elétrons a partir do interior da estrutura rígida da cadeia dupla para a superfície de eletrodo, contrariamente à estrutura flexível da cadeia simples que apresenta suas bases oxidáveis próximas à superfície do eletrodo, transferindo facilmente os elétrons (DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005).

1.1.6 Giardia lamblia

Giardia lamblia é um protozoário, intestinal, flagelado, parasita anaeróbio, com distribuição mundial (HAENDEL et al, 2007). Como pode ser visto na figura 17 (Ciclo biológico da *Giardia lamblia*), a infecção ocorre pela ingestão de cistos em água ou alimentos contaminados (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo). O protozoário causa a giardíase que apresenta sintomas como diarreia, má absorção

de nutrientes, perda de peso (HAENDEL et. al., 2007; BURET, 2008; WENSAAS, LANGLAND; RORTVEIT, 2010), distensão abdominal, náuseas, perda de apetite e vômitos em infecções crônicas, contudo, na maioria dos casos a infecção costuma ser assintomática (BURET, 2008). Este constitui um dos protistas mais prevalente, infectando o intestino delgado humano (LEITSCH, 2011; BURET, 2008) em cerca de 10% da população do mundo de forma endêmica e epidêmica (VALDEZ et al, 2009).

Figura 17 - Ciclo biológico da *Giardia lamblia*: (1) colônias de *G. lamblia* aderida à mucosa duodenal; (2) eliminação de trofozoítos em fezes diarreicas, que perecem ao chegar no exterior; (3) eliminação de cistos em fezes sólidas; (4) e 5) ingestão de cistos junto com alimentos ou água contaminada, que ao chegarem no duodeno formam colônias.



Fonte: NEVES, 2003

Em países desenvolvidos, a *G. lamblia* infecta cerca de 2% de adultos e de 6 a 8% de crianças (BUSATTI et. al., 2007) enquanto, em países subdesenvolvidos, a prevalência de giardíase varia de 20 a 60%, e a estimativa é de que existam cerca de 200 milhões de casos sintomáticos na África, Ásia e América do Sul (THOMPSON, 2000). Nesses países, a giardíase merece uma atenção especial, porque contribui enormemente para gerar adultos com deficiências físicas e mentais (HAENDEL et. al., 2007). Tem sido implicada nos distúrbios físicos (SIMSEK;

ZEYREK; KURCER, 2004) e de desenvolvimento cognitivo entre crianças (THOMPSON et al, 1993).

Apesar de sua significativa morbidade, causando considerável impacto socioeconômico, especialmente nos países subdesenvolvidos, a giardíase é largamente ignorada (BUSATTI et al, 2013). Ela constitui uma doença negligenciada, porém, uma variedade de agentes quimioterapêuticos tem sido utilizada para o seu tratamento. No entanto, muitos dos fármacos utilizados exibem efeitos secundários significativos e são contra-indicados, em alguns casos (BUSATTI et al, 2013).

O principal fármaco usado para o tratamento da giardíase é o MTZ, entretanto, existem outros fármacos eficientes como o benznidazol, o albendazol, o 5-nitrotiazol, a nitazoxanida, o 5-nitrofurano, a furazolidona e a quinacrina, um derivado de acridina (UPCROFT; UPCROFT, 2001). Derivados de MTZ são compostos com atividade giardicida eficiente (tabela 10, página 100), constituindo uma alternativa para o tratamento da giardíase (BUSATTI et al, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Investigar o comportamento eletroquímico do metronidazol e seus derivados, bem como a reatividade frente ao DNA, a fim de auxiliar no entendimento do mecanismo molecular de ação biológica desses compostos

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar o perfil voltamétrico para cada composto nos meios aprótico e prótico;
- ✓ Propor o mecanismo eletródico;
- ✓ Correlacionar o potencial do primeiro pico catódico (E_{plc}) com a atividade giardicida, já descrita na literatura;
- ✓ Investigar a reatividade dos compostos frente ao dsDNA e ao ssDNA.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Produtos químicos e solventes

Foram utilizados reagentes e solventes de grau P.A. Para os estudos realizados em meio aprótico, utilizou-se como solvente a solução de *N,N*-dimetilformamida (DMF), 99,8% AcroSeal[®], e como eletrólito de suporte (ES), o hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆), da Sigma Aldrich enquanto em meio prótico, utilizou-se uma solução a 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,2.

3.2 Preparações químicas

Todas as substâncias avaliadas no presente estudo (tabela 5) foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas, utilizando-se as técnicas espectrométricas usuais, por Lucas Lopardi Franco, aluno de doutorado, sob a supervisão do Prof. Dr. Ricardo José Alves, no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 5 - Metronidazol e seus análogos. a) Conjunto A: compostos com substituintes sem carácter fortemente abandonador; b) Conjunto B: compostos com substituintes com carácter fortemente abandonador (continua).

a)

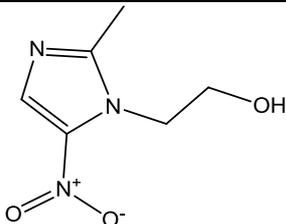
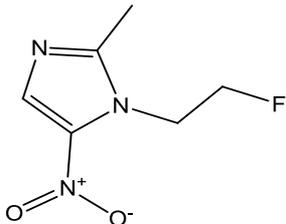
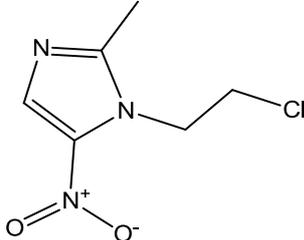
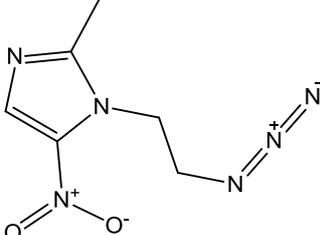
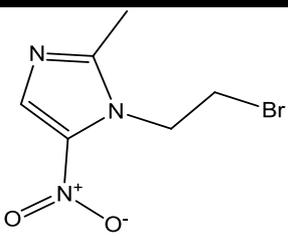
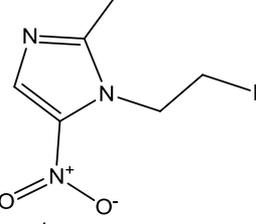
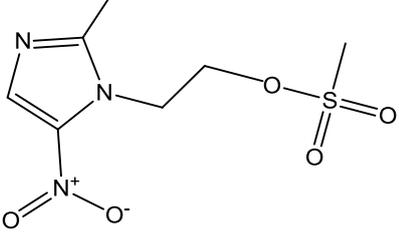
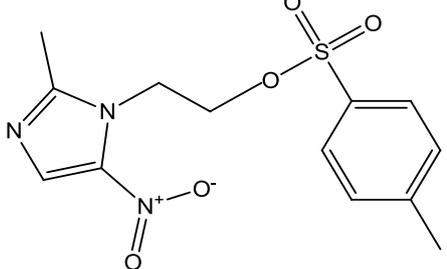
Nome IUPAC	Sigla	Estrutura Química	Massa Molar (g/mol)
1-(2-Hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol ou 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etanol	MTZ		171,06
1-(2-Fluoretil)-2-metil-5-nitroimidazol	F-MTZ		173,06

Tabela 5 - Metronidazol e seus análogos. a) Conjunto A: compostos com substituintes sem carácter fortemente abandonador; b) Conjunto B: compostos com substituintes com carácter fortemente abandonador (conclusão).

1-(2-Cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol	Cl- MTZ		189,03
1-(2-Azidaetil)-2-metil-5-nitroimidazol	N ₃ - MTZ		196,07
b)			
Nome IUPAC	Sigla	Estrutura Quimica	Massa Molar (g/mol)
1-(2-Bromoetil)-2-metil-5-nitroimidazol	Br- MTZ		232,98
1-(2-Iodoetil)-2-metil-5-nitroimidazol	I- MTZ		280,97
1-(2-Mesiloxietil)-2-metil-5-nitroimidazol	Ms- MTZ		249,04
1-(2-Tosiloxietil)-2-metil-5-nitroimidazol	Ts- MTZ		325,07

3.3 Estudos Eletroquímicos

Os ensaios eletroquímicos foram realizados à temperatura ambiente em potenciostato/galvanostato PGSTAT (SERIAL N°. AUT73222) da Metrohm Autolab® em um sistema de três eletrodos. A cela eletroquímica usada foi de vidro pyrex (5 mL) que continha 6 orifícios, dois deles, de pequeno diâmetro, tendo sido fechados. Um deles foi usado para a entrada e saída do gás inerte (Argônio). Nos três restantes foram acoplados três eletrodos, de trabalho, de referência e auxiliar, em condições favoráveis para a não entrada do ar. Como eletrodos de trabalho usou-se o carbono vítreo, diâmetro interno 1 mm (Catalog No. 002412) da Electrochemistry & Spectroelectrochemistry (AS), carbono vítreo, diâmetro interno 3 mm (MF-2012 BASi) e o eletrodo de ouro, diâmetro interno 3 mm (6.1204.320 Au) da Ω Metrohm. O eletrodo de prata, cloreto de prata (Ag/AgCl/Cl⁻(Sat), (MW-2030/09-2010 BASi) foi usado como eletrodo de referência, enquanto como eletrodo auxiliar, usou-se o fio de platina.

O tratamento dos dados foi realizado através do programa Origin 8.0 e alguns ajustes da linha de base para os voltamogramas de pulso diferencial na investigação da interação dos substratos com dsDNA foram feitos no programa Origin 6.0, não executável.

3.3.1 Ensaios em meio aprótico

Os ensaios em meio aprótico foram conduzidos usando-se como solvente a solução de Dimetilformamida (DMF) e o sal hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆). DMF é um solvente aprótico polar (hidrofílico) com alto ponto de ebulição. Há necessidade de se trabalhar com DMF totalmente anidro, pois, a presença de água interfere em estudos eletroquímicos, em meio aprótico. Para o presente experimento não houve necessidade de um pré-tratamento (purificação, por exemplo) do DMF porque foi adquirido já em condições ideais de uso.

O TBAPF₆ foi purificado por recristalização. Vinte e cinco gramas (25 g) de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆) foram dissolvidos em 100 mL de etanol a quente e sob agitação. Em seguida, resfriou-se até temperatura ambiente, esfriou-se na geladeira e filtrou-se. Este procedimento foi realizado três vezes e no fim, secou-se o sal a vácuo por um período de 48 horas de modo a evaporar-se toda

a quantidade de álcool usada para a dissolução. Depois de secado, o sal foi armazenado em frascos de estoque.

Uma das etapas durante a recristalização é a filtração a quente, porém, não foi realizada uma vez que provocava precipitação apesar de ter sido realizada sob vácuo, e uma vez que o sal não apresentava impurezas (partículas suspensas) visíveis a olho nu, esta etapa foi descartada.

Os eletrodos de trabalho foram preparados fazendo-se o devido polimento da sua superfície, utilizando-se alumina, com três granulometrias. Usou-se de forma sequenciada alumina de 1,0 μm ; 0,5 μm e 0,3 μm , nas três fases de polimento seguida de uma lavagem com água Milli-Q abundantemente e depois levados ao ultrassom em etanol, por 30 segundos. Diferentemente dos eletrodos de carbono vítreo que apenas tiveram uma limpeza mecânica, o eletrodo de ouro, depois do polimento com alumina, teve sua superfície tratada com pasta de diamante (1 μm) e o excesso era retirado com algodão encharcado em acetona, seguida de mais uma seção em ultrassom por 30 s em etanol, para remoção das partículas restantes. Particularmente ao eletrodo de ouro, antes da verificação da área eletroativa através de voltametria cíclica na solução de ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio de 1 mmol L^{-1} em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} , procedeu-se a limpeza eletroquímica, em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} , na faixa de potencial entre -0,4 a 1,5 V (0,1 V s^{-1}) durante 10 ciclos. Após a limpeza e verificação da área eletroativa, os eletrodos foram usados em estudos eletroquímicos em meio aprótico e prótico.

Em uma cela eletrolítica, adicionou-se o eletrólito de suporte (DMF + TBAPF₆), tendo-se desaerado sob agitação com gás inerte argônio durante 15-20 minutos. Fez-se apenas varreduras duplas do eletrólito de suporte na velocidade de 0,1 V s^{-1} ; 0,01 V s^{-1} e 100 Hz para VC, VPD e VOQ, respectivamente, com respectivo registro dos voltamogramas na faixa de potencial entre 0.5 a -2.8 V. Estudou-se a influência da velocidade de varredura em relação aos substratos em estudo (MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ, Br-MTZ, I-MTZ, N₃-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ) através de VC onde se variou a velocidade entre 0,01 a 1 V s^{-1} . Em VOQ, os voltamogramas foram registrados na frequência de 100 Hz (aquela que oferece melhor definição dos picos, com maiores intensidade e rapidez durante a execução experimental), enquanto em VPD, o registro foi a 0,01 V s^{-1} . Os ensaios foram conduzidos a uma concentração constante de 2 mmol L^{-1} para todos os compostos.

Alguns ensaios em meio aprótico foram realizados em eletrodo de ouro. Tal procedimento visava fundamentalmente investigar o comportamento eletroquímico de análogos com grupos fortemente abandonadores, comparando assim os voltamogramas registrados com aquele obtidos em carbono vítreo.

3.3.2 Ensaio em meio prótico.

Nos ensaios eletroquímicos em meio prótico, usou-se como eletrólito suporte solução tampão fosfato (pH 7,2) preparada pela dissolução de 1,38 g de fosfato monobásico (NaH_2PO_4) e 1,78 g de fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) em 100 mL de água purificada em um sistema Millipore. A determinação e o ajuste do valor de pH da solução foram feitos em pH-metro modelo Quimis Q400A. O procedimento experimental nas três técnicas (VC, VPD e VOQ) seguiu o mesmo protocolo feito em meio aprótico. Entretanto, a faixa de potencial para o registro dos voltamogramas foi restringida entre 0.5 a -1.5/-1.8 V.

3.4 Investigações da interação dos compostos com DNA (Calf Thymus)

3.4.1 Ensaio Espectroscópico

Os ensaios da interação do MTZ com o DNA por espectroscopia foram realizados num espectrofotômetro UV-Vis 8453 da AGILENTS TECHNOLOGIES. Trabalhou-se com tampão fosfato, pH 7,2 em meio etanólico (20% v/v), em concentrações fixas e variadas do MTZ e DNA.

3.4.2 Investigações da interação dos compostos com DNA por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

3.4.2.1 Preparo do gel de dsDNA e estudo da interação do filme formado com as amostras em análise (MTZ e seus análogos)

A preparação do gel de dsDNA consistiu na solubilização de 6,0 mg de dsDNA em 0,5 mL de tampão acetato (pH 4,5) seguida de refrigeração por tempo mínimo de 48 horas antes do uso, para completa solubilização e formação do gel de DNA. A modificação do carbono vítreo após polimento cuidadoso do mesmo nas condições descritas na seção 3.3.1 consistiu na colocação de cerca de 10 μL do gel de dsDNA. Antes da adição do gel, fez-se o condicionamento eletroquímico da superfície de ECV por VPD com cinco (5) varreduras subsequentes na faixa de

potencial entre 0 a +1,5 V a $0,005 \text{ V s}^{-1}$ com 120 segundos de tempo de condicionamento e sem aplicação de potencial. Este procedimento visava completa estabilização da superfície eletródica, de modo a ativá-la ou polarizá-la positivamente, permitindo interações eletrostáticas entre este e os grupos fosfato negativos do dsDNA, garantindo assim a imobilização do dsDNA. A formação do filme na superfície de CV consistiu em secar o gel de dsDNA num ambiente de argônio, em fluxo leve.

O eletrodo modificado com dsDNA foi posteriormente usado para as leituras em VPD na faixa de potencial entre -0,1 a +1,4 a uma velocidade de $0,005 \text{ V s}^{-1}$. As leituras foram feitas para o branco (tampão fosfato mais 20% de etanol), e para a amostra ($c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) nas seguintes condições: (i) com 15 minutos de contato, (ii) com potencial aplicado por 120 segundos (iii) com potencial aplicado por 240 segundos e finalmente (iv) depois de 10 ciclos em voltametria cíclica (faixa de -1,2 a 0 V), seguida imediatamente de VPD na faixa de potencial em referência. Para cada leitura fazia-se um novo polimento do eletrodo até se obter a área eletroativa similar à do início do experimento, novo condicionamento e nova formação do filme de dsDNA.

3.4.2.2 Preparo da solução de ssDNA pelo método ácido-base e estudo da interação da mesma com as amostras.

A solução de ssDNA é preparada pela desnaturação do dsDNA, onde pesou-se 3,0 mg deste e adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) seguida de aquecimento a $\pm 100 \text{ }^\circ\text{C}$, em banho-maria até solubilização completa durante uma (1) hora. Para neutralização da acidez, adicionou-se 1,0 mL de solução de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e, completou-se o volume para 10,0 mL com solução tampão acetato (pH 4,5). Esta solução foi deixada em armazenamento sob refrigeração por um período de pelo menos 24 horas para sua estabilização.

Com a solução de ssDNA estável, fez-se a leitura do branco na faixa de potencial anódica na técnica de VPD a $0,005 \text{ V s}^{-1}$ (0 a +1,4 V) e depois o estudo da interação dos substratos com ssDNA nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após cada adição de alíquota da amostra, esperava-se quinze (15) minutos para permitir sua interação com a solução de ssDNA. Na última concentração ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) fez-se também uma varredura com aplicação de potencial de redução característico dos mesmos.

Para melhorar a visualização e identificação dos picos, tanto no dsDNA quanto no ssDNA, os voltamogramas são apresentados com linha de base corrigida a partir do software GPES 4.9, seguindo os seguintes passos: Na janela de trabalho do programa seleciona-se Edit data → Baseline correction → Moving average → Make correction → Ok, e depois pelo Origin 6.0 (particularmente para os voltamogramas registrados através do filme dsDNA), que segue os seguintes passos: na janela do trabalho, clica se em Tools → Baseline → Automatic → Modify → Subtract.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da voltametria cíclica foram obtidos os resultados experimentais referentes ao estudo eletroquímico das amostras (MTZ e seus análogos) em meios aprótico e prótico, tendo se verificado a influência da velocidade para cada pico catódico na faixa entre 0,01 e 1 $V s^{-1}$, visando adquirir informações qualitativas que auxiliam na elucidação do mecanismo de transferência eletrônica. Foi também registrado o perfil voltamétrico para cada composto, usando as técnicas de VPD e VOQ, nas velocidades de 10 $mV s^{-1}$ e 100 Hz, respectivamente. A técnica de VPD foi ainda usada para a investigação eletroquímica da interação das amostras com o dsDNA e o ssDNA.

4.1 Estudo do Metronidazol e seus análogos em meio aprótico por voltametria cíclica.

Objetivando-se associar algumas características comuns mais evidentes e, facilitar a análise e discussão dos voltamogramas registrados em meio aprótico, os compostos foram agrupados em dois conjuntos: Conjunto A, constituído pelas substâncias MTZ, F-MTZ, N_3 -MTZ e Cl-MTZ, todos com o primeiro pico catódico menos intenso em relação ao segundo, evidenciando também um comportamento de reversibilidade (onda Ia) na varredura reversa em quase todas as velocidades escolhidas para o estudo. No conjunto B fazem parte Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ, cuja característica principal é a presença do primeiro pico catódico mais intenso que o segundo e, sem o seu correspondente anódico na varredura reversa em quase todas as faixas de velocidades empregadas.

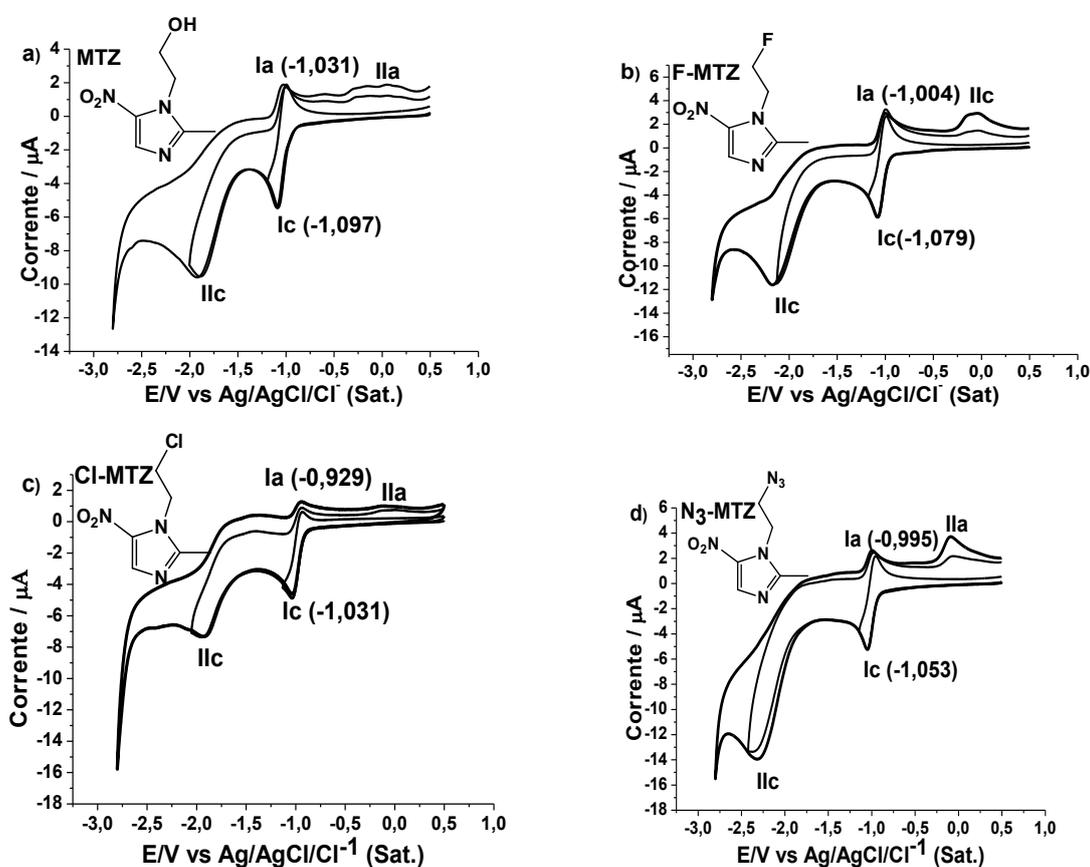
Parâmetros específicos que ajudam na análise do processo eletródico estão definidos na literatura, dentre eles destacam-se o tipo de transporte de massa, o mecanismo de transferência de elétrons envolvido, a razão dos picos anódico e catódico, a relação entre a corrente e a concentração, etc.

4.1.1 Análise do perfil voltamétrico dos substratos agrupados no conjunto A

Conforme pode ser observado a partir dos voltamogramas registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$) a 0,1 $V s^{-1}$, concentração de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para cada composto deste conjunto (figura 18), a redução em meio aprótico é caracterizada por dois picos de onda, sendo o primeiro correspondente à formação do ânion radical

nitro ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) numa transferência monoelétrica reversível e o segundo em potenciais mais negativos que o primeiro, que pela intensidade de corrente associada à falta do seu correspondente anódico, presume-se corresponder a um processo multi-elétrico, totalmente irreversível que leva à formação do ânion radical nitroso $[(\text{RNO})^{\cdot-}]$, figura 19], entre outros produtos de redução estendida, tal como pode ser julgado pelo aparecimento do pico IIa e/ou ombro IIa na varredura reversa (ANDRES; ECMANN; SMITH 2013).

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos de MTZ e seus derivados em DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹; eletrodo de carbono vítreo (d = 1 mm); c = 2 mmol L⁻¹; v = 0,1 V s⁻¹.



Fonte: Autor, 2015.

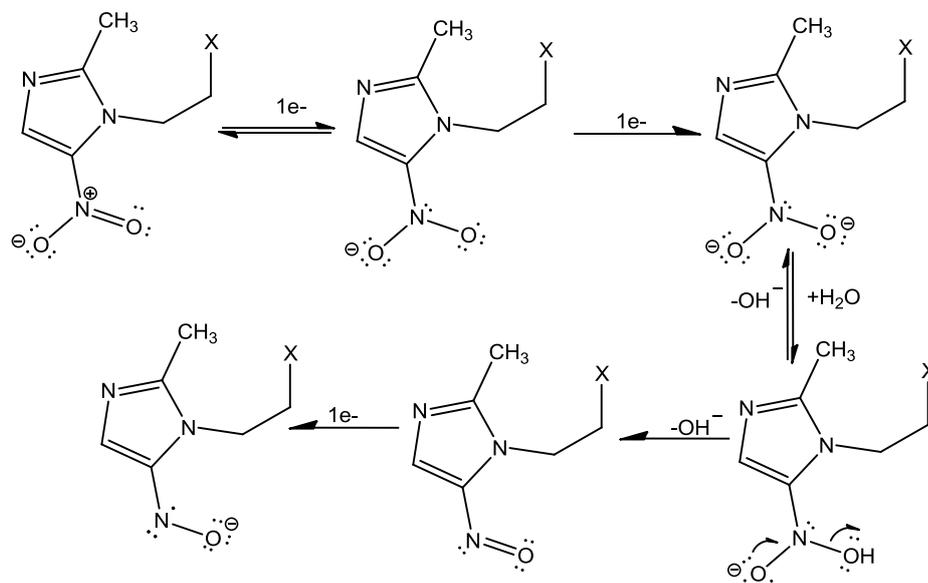
Ainda na varredura reversa, é possível observar o pico anódico designado por Ia. Feito o corte para a primeira onda catódica (Ic) comprova-se a presença do seu correspondente anódico, revelando a estabilidade do ânion radical nitro, contrariamente ao corte após a segunda onda de redução (IIc), pois, não se evidencia o par anódico correspondente e presume-se que este seja instável (CAVALCANTI, 2004).

Muitas similaridades são verificadas para estes compostos. Segundo dados obtidos a partir de VCs, mostrados na figura 18, seus picos de redução e oxidação aparecem em potenciais bem próximos, particularmente para MTZ, F-MTZ, N₃-MTZ, figura 18a, b e d, respectivamente. O par redox *Ic/Ia* apresenta intensidade de corrente (altura dos picos) muito próxima. Para todos os compostos do conjunto A, cortes feitos em potenciais próximos a E_{plc} evidenciam o surgimento da onda de pico Ia e sem o aparecimento da onda IIa, o que comprova que esta última é dependente da segunda redução, aparecendo apenas em velocidades elevadas (a partir de 0,1 V s⁻¹) no corte do segundo pico de redução (IIc) para o Cl-MTZ (figura 18c), enquanto para os outros é evidente mesmo em velocidades abaixo de 0,1 V s⁻¹.

Particularmente ao derivado inédito (F-MTZ), figura 18b, a onda anódica IIa manifesta-se de forma evidente a partir de velocidades menores (0,035 V s⁻¹) diferentemente ao que acontece com o padrão MTZ e os derivados N₃-MTZ e Cl-MTZ. Embora o segundo pico de redução seja mais intenso que o primeiro para todos, algumas diferenças existem entre eles: ele é mais acentuado no derivado N₃-MTZ com menor intensidade de corrente para Cl-MTZ, enquanto MTZ e F-MTZ estão na intermediária. Estas diferenças podem ser explicadas pelo efeito do grupo substituinte, sua polarização bem como a tendência de continuar covalentemente ligado ou não após a primeira redução. O derivado Cl-MTZ apresenta um comportamento intermediário entre os dois conjuntos (para além do seu pico IIc menos intenso, seu potencial de redução, E_{plc} é menos catódico em relação aos outros do conjunto A), fato que pode ser justificado por ser um grupo abandonador mediano, como pode ser visto nas tabelas em anexo (tabelas 12 e 13 na página 122) sobre a habilidade dos grupos abandonadores.

A partir dos valores dos potenciais de redução do primeiro pico (figura 18), é possível estabelecer uma ordem na facilidade de redução destes substratos: Cl-MTZ > N₃-MTZ > F-MTZ > MTZ.

Figura 19 - Racionalização mecanística das etapas envolvidas no processo de redução dos compostos do conjunto A em meio aprótico.



Fonte: ANDRES; ECMANN; SMITH, 2013, adaptado.

O processo mecanístico destacado na figura 19, partindo do ânion radical (após primeira redução) envolve dois elétrons, que podem ser correspondentes tendo em conta o tamanho do pico IIc na figura 18, especificamente para os compostos MTZ, F-MTZ e N₃-MTZ, mas o tamanho do pico IIa para todo o 5-nitroimidazol inicial reduzido pode indicar a ocorrência de reações adicionais ou acopladas como protonação (devido à água residual do solvente) do ânion radical nitroso (RNO^{•-}) conduzindo à dimerização e formação de grupo azoxi que também pode sofrer outras reações, por exemplo, uma redução quimicamente irreversível ao azo e hidrazo, o que pode explicar a falta da corrente de oxidação na varredura reversa (ANDRES; ECMANN; SMITH 2013). A partir da descrição acima bem como a razão $I_{plc}/v^{1/2}$, (tabela 6a, b, c e d) que tende a diminuir com o aumento da velocidade (v), o mecanismo mais provável para estes compostos seria ECE; pois, em reações eletródicas ECE, a relação $I_{plc}/v^{1/2}$ varia com a velocidade, mas pode atingir um valor limite em altas ou baixas velocidades de varredura. $I_{plc}/v^{1/2}$ (baixas velocidades) $>$ $I_{plc}/v^{1/2}$ (altas velocidades) (SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP, 2011).

Tabela 6 - Análise da razão $I_{pc}/v^{1/2}$ para os compostos MTZ (a), F-MTZ (b), CI-MTZ (c) e N₃-MTZ (d).

a)

MTZ	
v (V s ⁻¹)	$I_{pc}/v^{1/2}$
0,010	19,3115
0,020	18,0035
0,035	17,3400
0,050	17,1635
0,075	16,9068
0,100	17,1682
0,200	16,6845
0,300	16,5535
0,400	16,5554
0,500	16,5685
1,00	16,5527

b)

F-MTZ	
v (V s ⁻¹)	$I_{pc}/v^{1/2}$
0,020	19,5658
0,035	19,2779
0,050	19,2284
0,075	19,1333
0,100	19,0500
0,200	18,9500
0,300	18,8436
0,400	18,6206
0,500	18,4416
1,00	18,0145

c)

CI-MTZ	
v (V s ⁻¹)	$I_{pc}/v^{1/2}$
0,010	22,5800
0,020	21,1605
0,035	18,4400
0,050	17,7736
0,075	16,8823
0,100	16,4734
0,200	16,0499
0,300	16,2972
0,400	16,3383
0,500	16,5253
1,00	22,5800

d)

N ₃ -MTZ	
v (V s ⁻¹)	$I_{pc}/v^{1/2}$
0,010	18,3441
0,020	16,9547
0,035	16,3987
0,050	15,3552
0,075	14,2903
0,100	16,2514

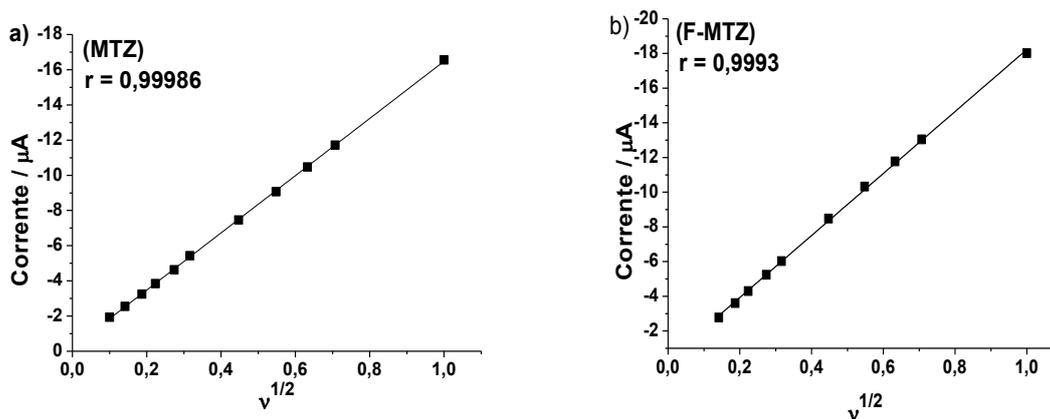
4.1.1.1 Análise da velocidade de varredura: sua relação com a Intensidade e Potencial do primeiro pico catódico.

Alguns dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, como os potenciais dos picos catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}) e as correntes do pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) em função da velocidade de varredura em voltametria cíclica fornecem informações fundamentais no entendimento do mecanismo eletroquímico envolvido. Os critérios diagnósticos dos diferentes processos eletródicos explicam o transporte que controla um determinado processo eletroquímico através da relação entre a corrente de pico, I_p e a velocidade de varredura, v . Assim, em processos controlados

por difusão, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($I_p \sim v^{1/2}$) quer em processos reversíveis assim como em irreversíveis e naqueles controlados por adsorção, a corrente de pico varia linearmente com a velocidade ($I_p \sim v$).

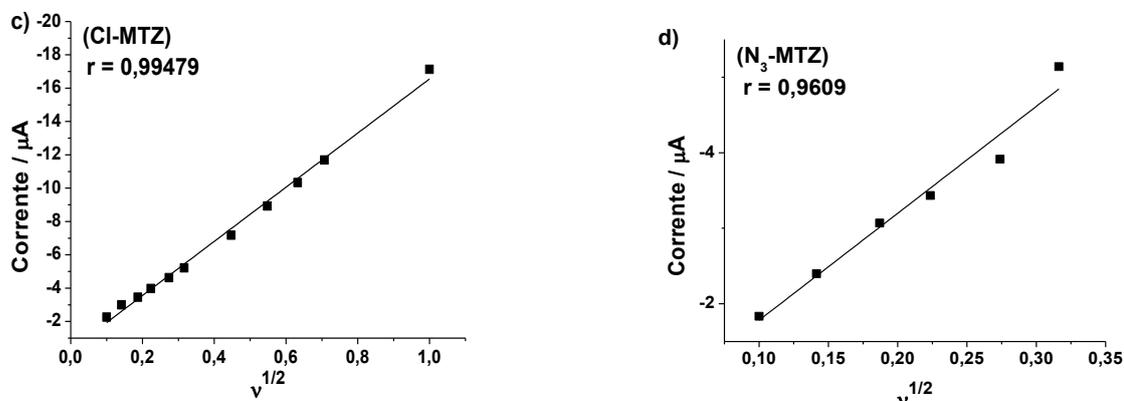
Nos experimentos realizados, observa-se que a intensidade de corrente, para estes compostos é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade, ou seja, o processo de transporte de massa até a superfície eletródica é controlado por difusão (figura 20). Um dos critérios usados para julgar a reversibilidade química das reações eletródicas é a razão entre as correntes anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}). Para um processo reversível ou nernstiano (sistema no qual a velocidade de transferência de elétrons é alta, com controle realizado por transporte de massa), em que a espécie eletrogerada é estável, esta razão é constante e igual a unidade (BARD; FAULKNER, 1944; ZANELLO, 2003; WANG, 2006). Uma vez que os valores de I_{pa}/I_{pc} são próximos à unidade, os processos em análise são classificados em nernstianos ou sistemas reversíveis com produto estável para a primeira onda. A razão de corrente, I_{pa}/I_{pc} , é igual à unidade apenas se $\alpha = 0,5$. Caso contrário, se $\alpha > 0,5$, $I_{pa}/I_{pc} < 1$; se $\alpha < 0,5$, $I_{pa}/I_{pc} > 1$ (ZANELLO, 2003).

Figura 20 - Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$ (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ. (continua).



Fonte: Autor, 2015

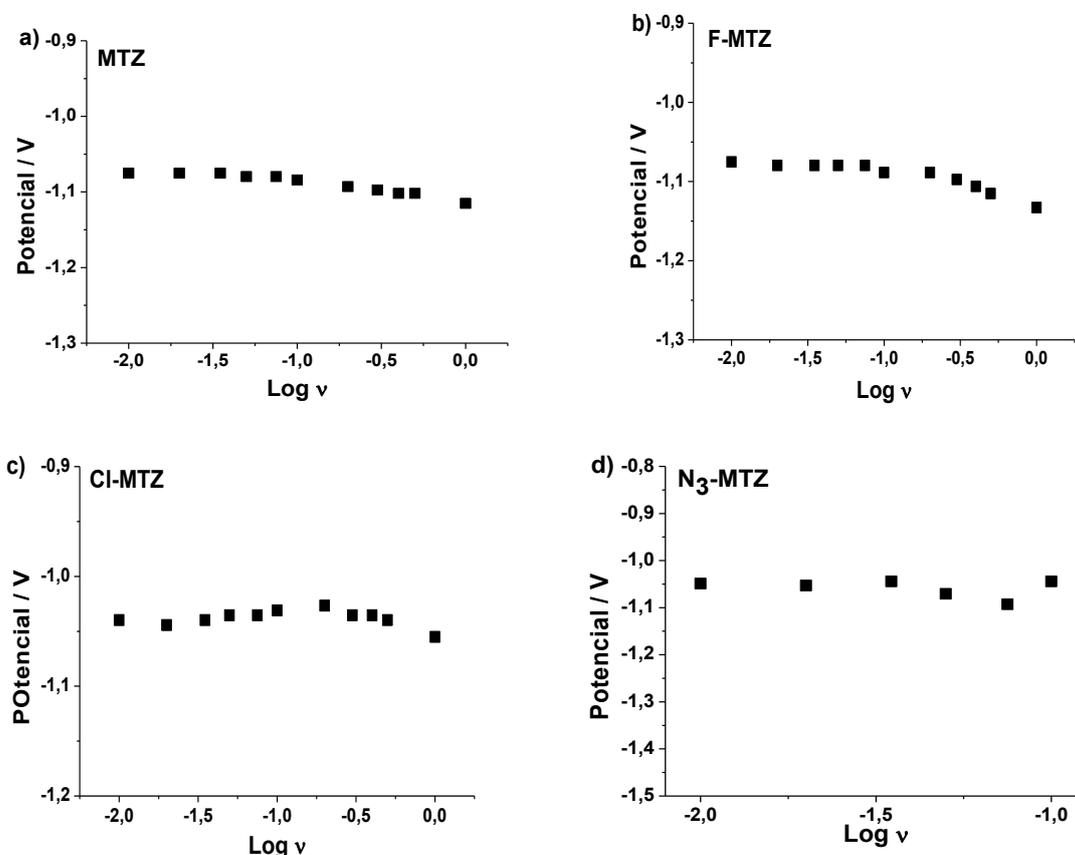
Figura 20 - Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$ (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ. (conclusão).



Fonte: Autor, 2015

Tão quanto a razão das correntes dos picos anódico e catódico (I_{pa}/I_{pc}), o potencial de separação dos picos (ΔE_p) é outro parâmetro importante usado nos critérios de diagnóstico dos sistemas nernstianos (ZANELLO, 2003). Para o potencial do primeiro pico catódico (E_{p1c}), verifica-se um deslocamento (para valores de potencial negativo para as etapas de redução), principalmente com o aumento da velocidade, um comportamento típico de sistemas reversíveis ou quase-reversíveis e, na sua relação com o logaritmo decimal da velocidade de varredura, $\log v$, observa-se uma ligeira variação entre os dois parâmetros, onde em velocidades crescentes, a reta definida pelo gráfico E_{p1c} vs. $\log v$ apresenta-se com uma inclinação sutil, sugerindo uma relação de ligeira variância com o potencial, sendo que em alguns casos os dados são crescentes e decrescentes, figura 21. Assim, a partir das observações acima registradas, bem como pela presença da onda anódica, I_a , referente ao primeiro processo catódico, I_c , e a razão I_{pa}/I_{pc} próxima a unidade (tabela 7) presume-se que o primeiro processo de redução seja de natureza reversível, conforme ditam os testes de diagnóstico (ZANELLO, 2003; OLIVEIRA, 2004; DE SOUZA, 2011).

Figura 21 - Gráfico da relação entre o potencial do pico catódico (E_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹) para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ.



Fonte: Autor, 2015

Tabela 7 - Parâmetros eletroquímicos para os compostos do conjunto A. Eletrodo de Carbono Vítreo ($d = 1$ mm), E/V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.), $v = 0,100$ V s⁻¹.

Substrato	$-E_{plc}$ (V)	$-E_{pla}$ (V)	ΔE_1 (mV)	$-E_{pllc}$ (V)	$-I_{pla}$ (μ A)	$-I_{plc}$ (μ A)	I_{pla}/I_{plc}
MTZ	1.097	1.031	66	1.929	4.9 \pm 1	5.4 \pm 1	0.907
F- MTZ	1.079	1.004	75	2.177	5.9 \pm 1	6.0 \pm 0	0.983
Cl- MTZ	1.031	0.929	102	1,929	4.4 \pm 0	4,8 \pm 1	0.916
N ₃ - MTZ	1.053	0.995	58	2.323	5.3 \pm 1	5.1 \pm 1	1.039

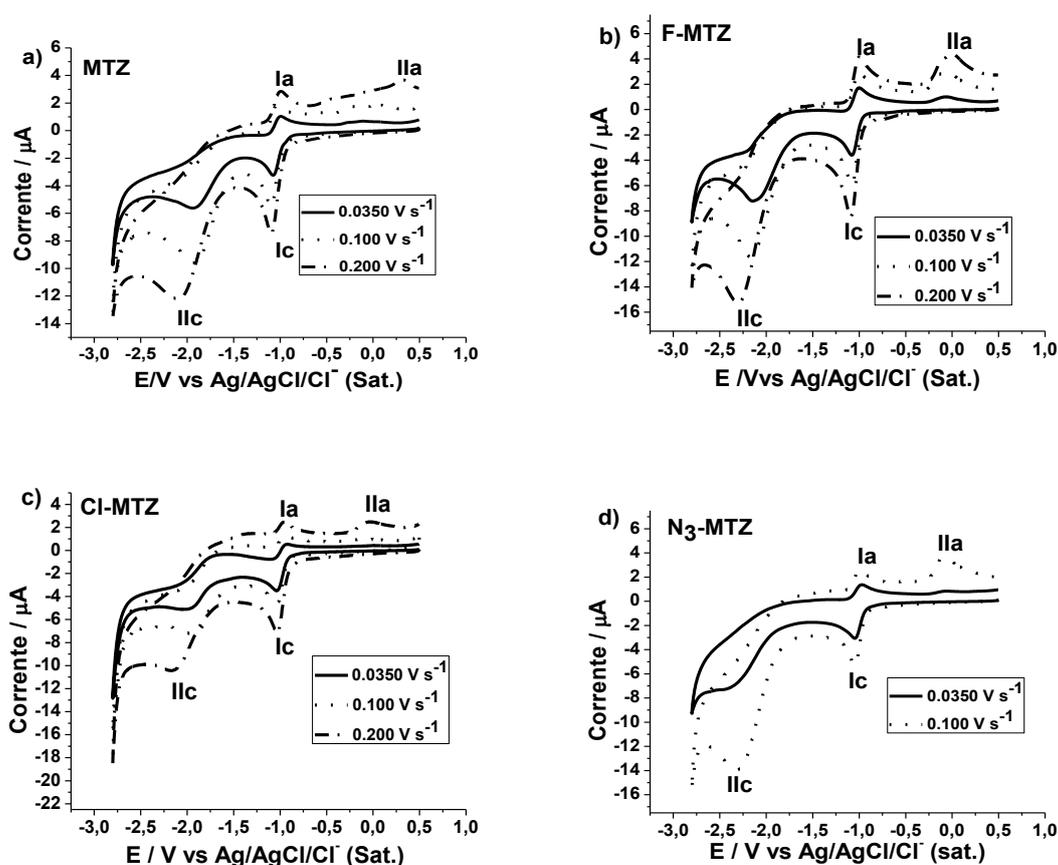
Fonte: Autor, 2015.

4.1.1.2 Comparação dos voltamogramas em função da velocidade, dos compostos do conjunto A.

Para as substâncias em análise (conjunto A, figura 22) existem algumas manifestações constantes para todas elas. Com o aumento da velocidade de varredura, o agrupamento formado pelos picos I_c assim como I_{lc} intensifica-se. O deslocamento catódico é verificado apenas para o pico I_{lc} em velocidades

superiores ($v > 0,100 \text{ V s}^{-1}$) assim como para o agrupamento de picos IIa. Este comportamento indica uma forte dependência do potencial de pico com a velocidade de varredura, um caso típico para transferência de elétrons controladas cineticamente, por causa da forte dependência do potencial com as constantes de velocidade de transferência de elétrons (ANDRES; ECMANN; SMITH 2013).

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos em velocidades diferentes ($v = 0,035, 0,100$ e $0,200 \text{ V s}^{-1}$ para os compostos MTZ, F-MTZ, CI-MTZ e N_3 -MTZ (DMF + TBAPF₆ $0,100 \text{ mol L}^{-1}$)



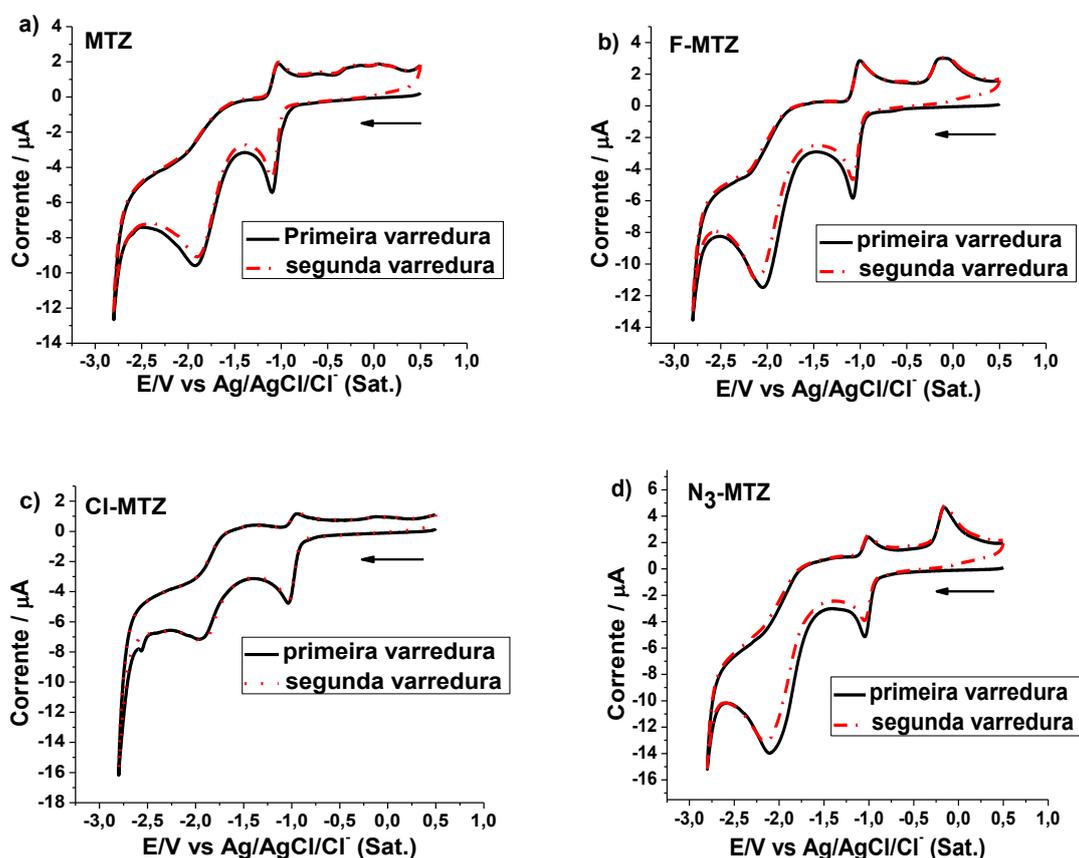
Fonte: Autor, 2015.

Os picos Ic e Ia se mantêm praticamente constantes, enquanto o agrupamento de picos designados por IIa não se manifesta em velocidades abaixo de $0,100 \text{ V s}^{-1}$ para MTZ e CI-MTZ e N_3 -MTZ.

4.1.1.3 Comparação dos voltamogramas sucessivos (primeira e segunda varreduras) para o conjunto A.

A análise da varredura sucessiva na VC permite a inferência e compreensão das espécies geradas assim como consumidas na superfície eletródica. Para os voltamogramas dos compostos do conjunto A (figura 23), observou-se um deslocamento sutil assim como uma ligeira diminuição da intensidade dos picos da segunda varredura, revelando passivação da superfície eletroativa com o aumento do número de varreduras.

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos em varreduras sucessivas para os compostos MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ; (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹); $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$.



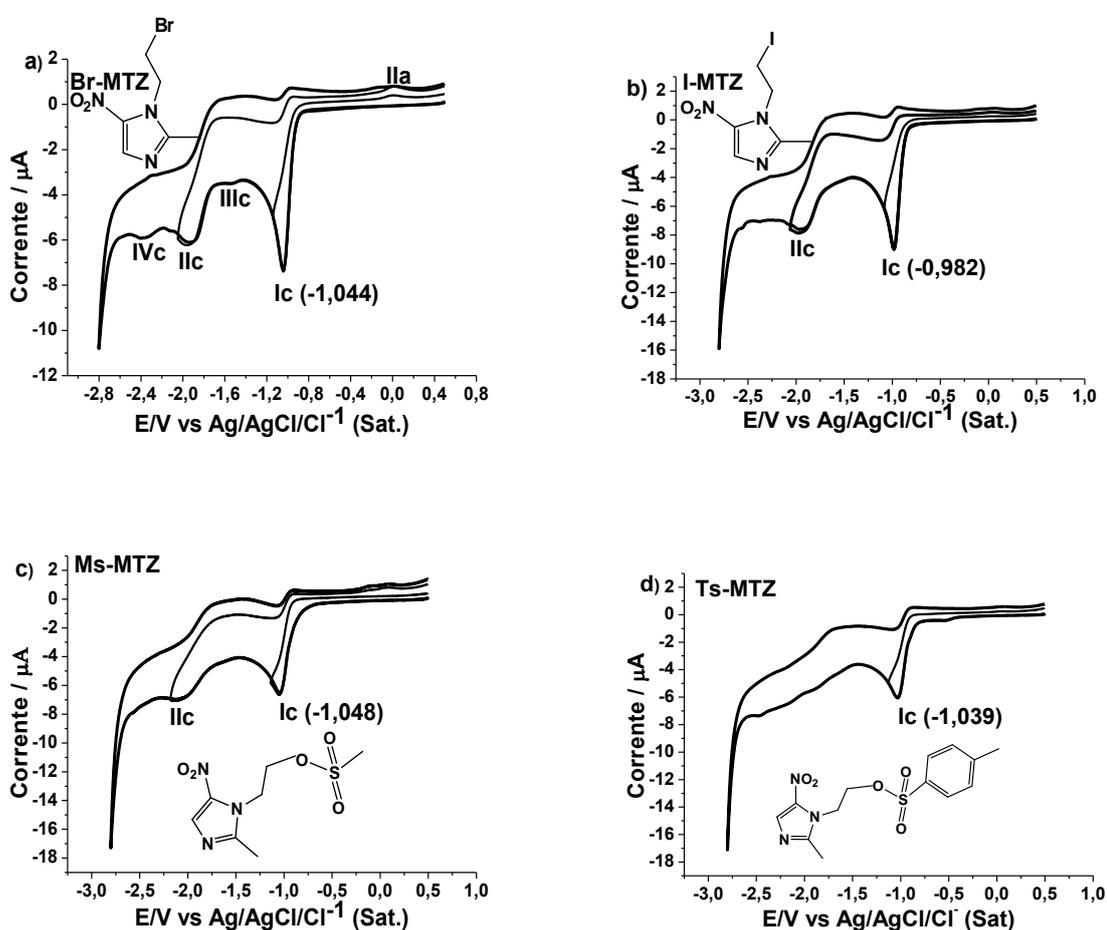
Fonte: Autor, 2015.

4.1.2 Análise do perfil voltamétrico dos compostos no conjunto B

A partir dos dados dos voltamogramas registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$) a $0,100 \text{ V s}^{-1}$, concentração de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (figura 24), a redução destes compostos em meio aprótico é caracterizada por dois picos catódicos. Diferentemente dos compostos agrupados no conjunto A, os do conjunto B

apresentam o primeiro pico de redução mais intenso que o segundo, e ainda mais, não exibem o correspondente anódico. Tal como no conjunto A, a primeira onda de redução corresponde à formação do ânion radical nitro ($\text{RNO}_2^{\bullet-}$) numa transferência monoelétrica, porém, para este caso a transferência de elétrons é irreversível, e o segundo em potenciais mais negativos que o primeiro, levando provavelmente à formação do radical centrado no C1 (da cadeia lateral) e liberação do substituinte num processo irreversível.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos dos derivados do MTZ em DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹; eletrodo de carbono vítreo (d = 1 mm); c = 2 mmol L⁻¹; $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$



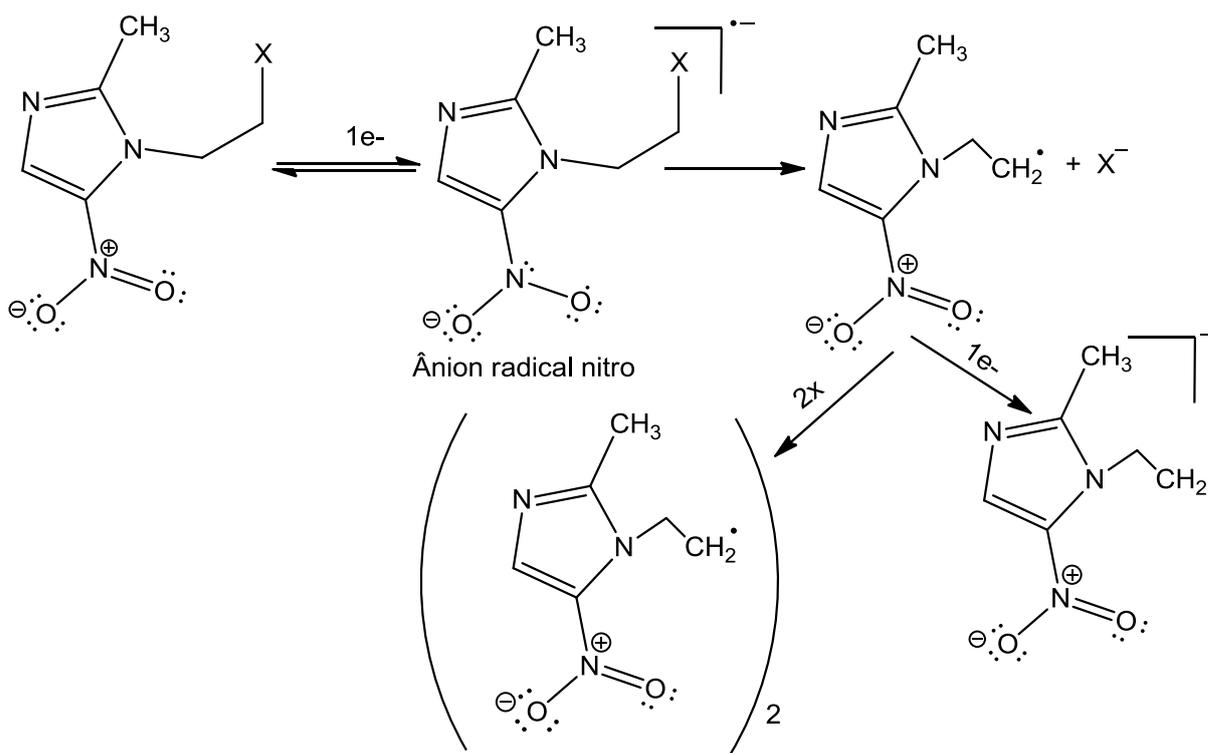
Fonte: Autor, 2015

À exceção do derivado substituído por tosila com um só pico catódico, e sem o seu correspondente anódico (figura 24d), os restantes (bromado, clorado e mesilado) apresentam dois picos de redução, mas também sem a correspondente onda de oxidação Ia. O pico de onda IIa só é bem evidente em velocidades

superiores (a partir de 0.200 V s^{-1}). O derivado bromado mostrou ainda ombros IIIc e IVc em quase todas as velocidades.

O emprego de alguns critérios de diagnóstico (dependência do E_p com a velocidade, por exemplo), a ausência da onda la correspondente na varredura reversa permite sugerir que o processo mecanístico para os compostos do conjunto B, figura 25, é ECE (CAVALCANTI et al, 2004), onde devido à presença de um grupo fortemente abandonador, ocorre uma eliminação redutiva de primeira ordem pelo processo de transferência de elétrons dissociativa (TED). É ainda possível dar lugar a outros processos acoplados como as reações de dimerização.

Figura 25 - Racionalização mecanística das etapas envolvidas no processo de transferência de elétrons dissociativa para os compostos com grupos fortemente abandonadores em meio aprótico.

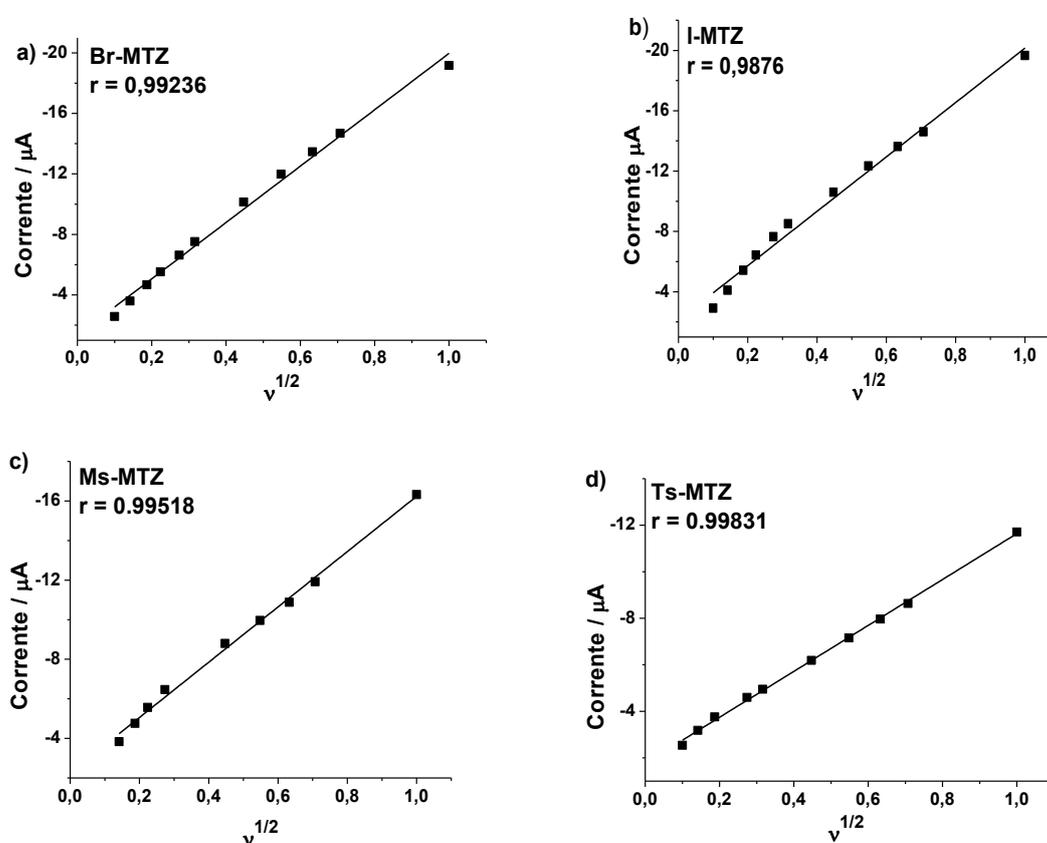


Fonte: OLIVEIRA, 2004; ÁLVAREZ-GRIERA; GALLARDO; GUIRADO, 2009; ANDRES; ECMANN; SMITH 2013; adaptado.

4.1.2.1 Análise do efeito da velocidade de varredura para os compostos do conjunto B: sua relação com a Intensidade e Potencial do primeiro pico catódico.

Similarmente aos compostos do conjunto A, para o conjunto B, verificou-se que o processo de transporte de massa até a superfície eletródica é controlado por difusão, pois, há uma proporcionalidade direta entre a corrente de pico (I_c) e a raiz quadrada da velocidade (figura 26).

Figura 26 - Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda em função da raiz quadrada da velocidade, $v^{1/2}$ (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹) para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ

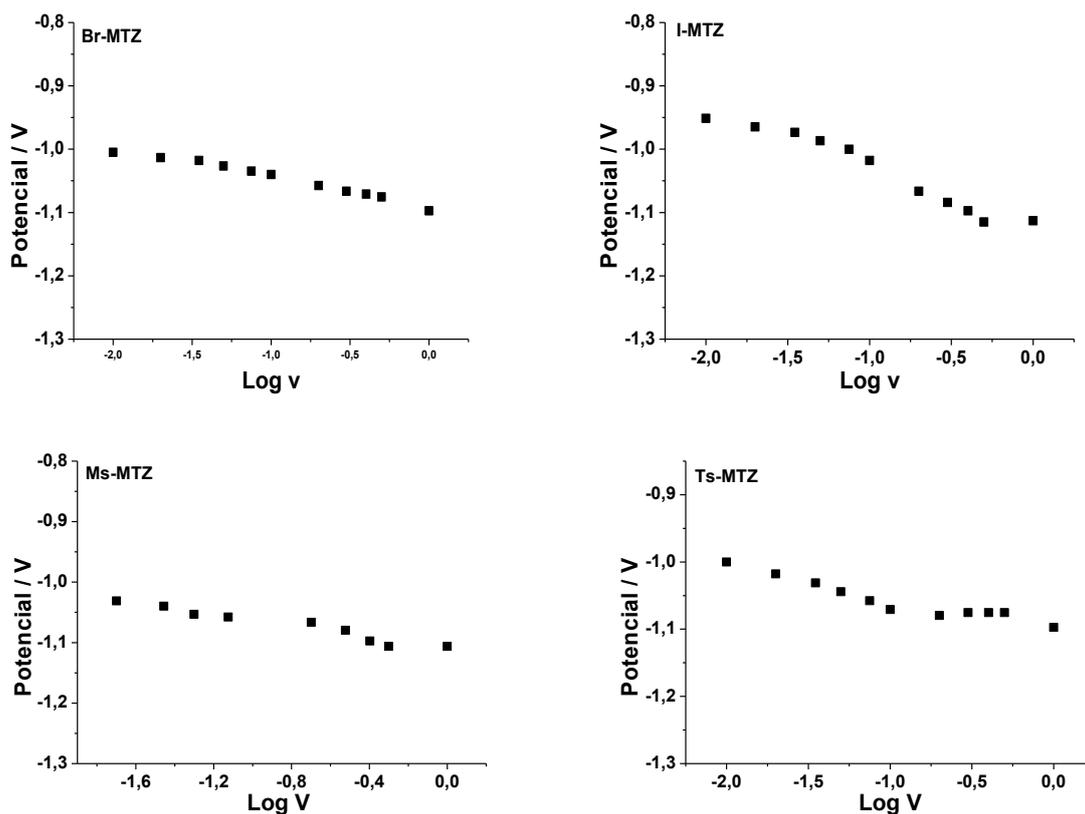


Fonte: autor, 2015.

Nos processos irreversíveis, o potencial do pico catódico direto (E_{pc}) desloca com a velocidade de varredura (para valores mais catódicos para processos de redução) (ZANELLO, 2003). Assim, no que tange à relação entre o potencial do primeiro pico catódico (E_{plc}) e o logaritmo decimal da velocidade de varredura, $\log v$, observa-se uma oscilação evidente entre os dois parâmetros, onde em velocidades crescentes a reta definida pelo gráfico E_{plc} vs. $\log v$ apresenta-se majoritariamente decrescente, figura 27. Esta verificação associada à ausência da onda anódica, la

na varredura inversa do potencial e o valor do potencial de pico e o potencial de meio pico diferentes por um valor ligeiramente superior a $48/\alpha n$ mV (tabela 8) presume-se que o processo de redução seja irreversível (WANG, 2006).

Figura 27 - Gráfico da relação entre o potencial do pico catódico (E_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹) para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ



Fonte: Autor, 2015

Tabela 8 - Parâmetros eletroquímicos para os substratos do conjunto B. Eletrodo de Carbono Vítreo (d = 1 mm), E/V vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

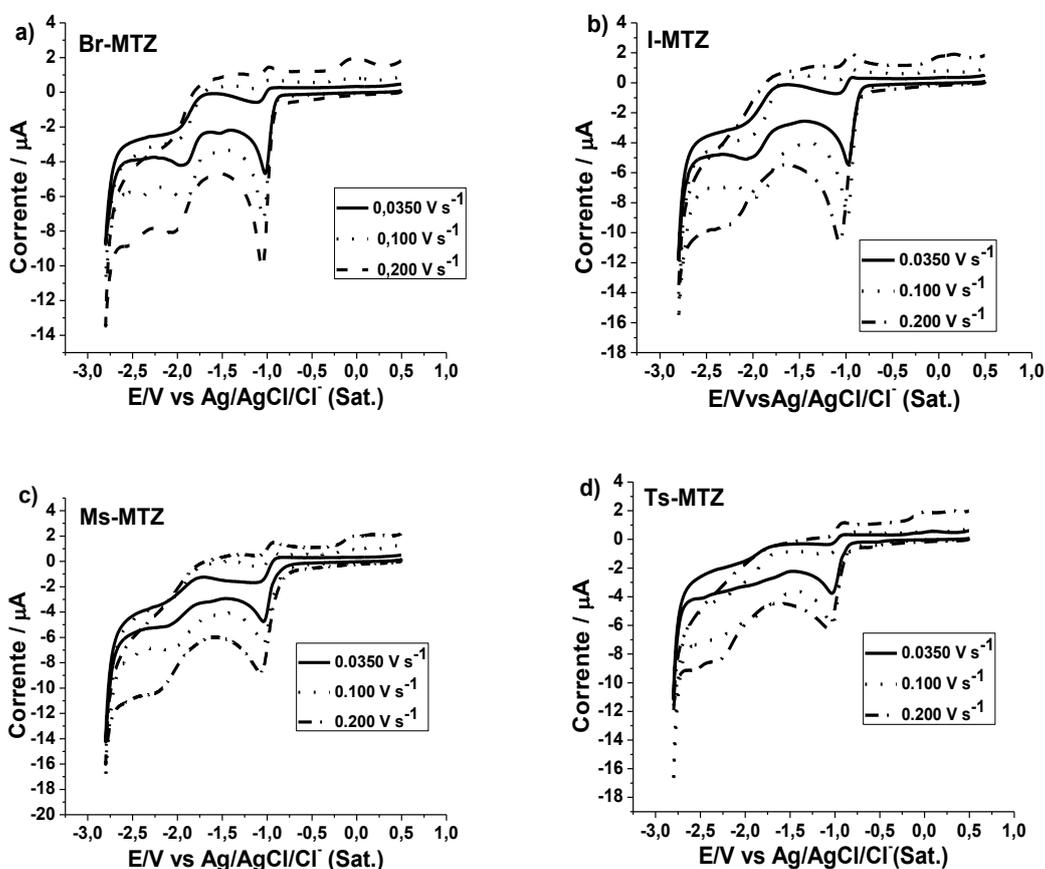
Composto	$-E_{plc}$ (V)	$E_{plc}-E_{plc}/2$ (mV)	$-E_{pllc}$ (V)	$-I_{plc}$ (μA)
Br-MTZ	1,044	52,2	1,947	7,315
I-MTZ	0,982	49,1	1,960	8,956
Ms-MTZ	1,048	52,5	2,128	6,549
Ts-MTZ	1,039	51,9	---	6,033

Fonte: Autor, 2015.

4.1.2.2 Comparação dos voltamogramas em função da velocidade de varredura dos substratos do conjunto B.

Analisando os voltamogramas deste conjunto para as três velocidades em referência (0,0350; 0,100 e 0,200 V s^{-1} , figura 28) há um comportamento bem definido e constante para todos. Para além da intensificação dos picos de onda Ic e Ilc, com o aumento da velocidade de varredura, a partir da velocidade de 0,200 V s^{-1} , existe uma tendência de deslocamento do pico Ic, um deslocamento significativo do pico Ilc bem como manifestação de quase-reversibilidade, pois, verifica-se o aparecimento do pico Ia na varredura reversa. Desta forma, tal como foi argumentado para o conjunto A, este comportamento indica uma forte dependência do potencial de pico com a velocidade de varredura, um caso típico para transferência de elétrons controlada cineticamente.

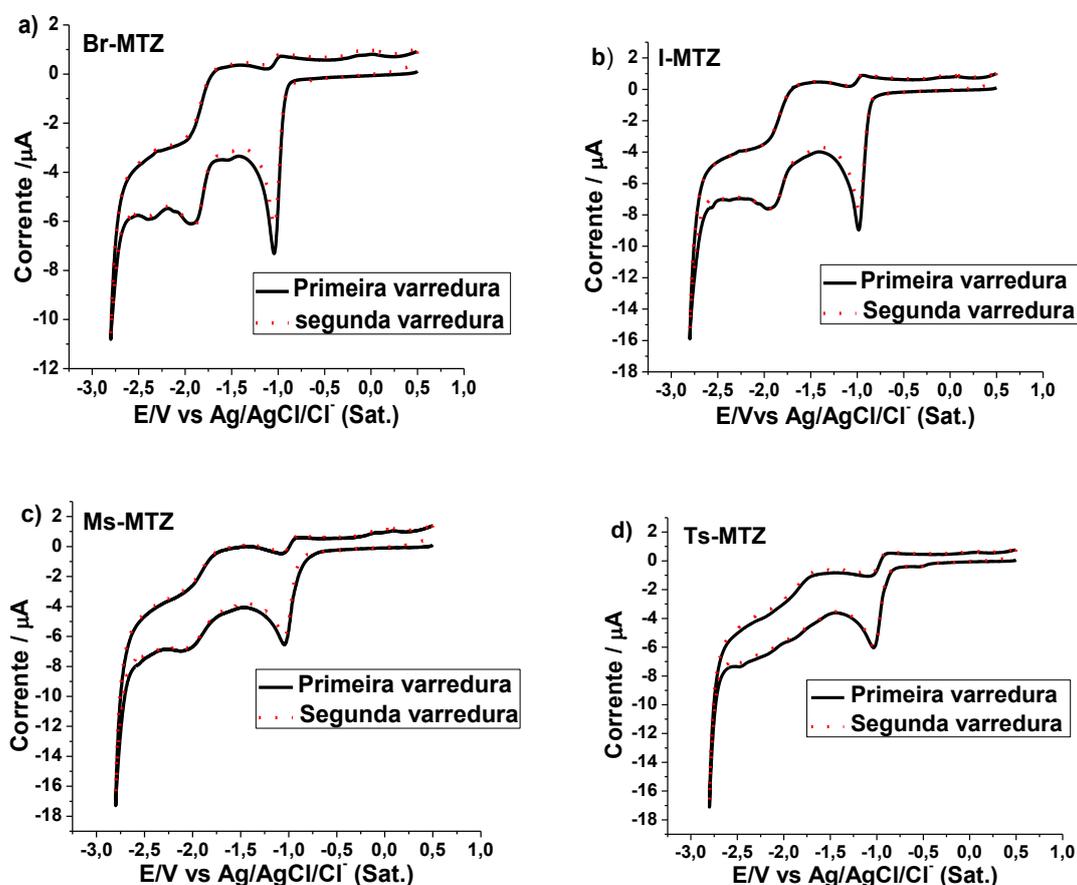
Figura 28 - Voltamogramas cíclicos em velocidades diferentes ($v = 0,0350, 0,100$ e $0,200 \text{ V s}^{-1}$ para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ; (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹)



4.1.2.3 Comparação dos voltamogramas sucessivos (primeira e segunda varredura) para o conjunto B.

Para os voltamogramas dos compostos deste conjunto (figura 29), notou-se um deslocamento sutil assim como uma ligeira diminuição da intensidade dos picos na segunda varredura.

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos em varreduras sucessivas para os compostos Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ; (DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹); $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$



Fonte: Autor, 2015.

Genericamente, usando o eletrodo de carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$), em meio aprótico, a facilidade de redução dos oito compostos, representada pelo potencial de redução da primeira onda (E_{plc}), tabelas 7 e 8 segue a seguinte ordem: I-MTZ > Cl-MTZ > Ts-MTZ > Br-MTZ > Ms-MTZ > N₃-MTZ > F-MTZ > MTZ.

É sabido que os potenciais de redução desempenham um papel fundamental na atividade giardicida (TOWMSON et al, 1994; BUSATTI et al, 2007), e correlações entre os potenciais de redução e a eficácia farmacológica ou de

toxicidade podem ser descritas (LIVERTOUX; LAGRANGE; MINN, 1996). Assim, uma vez que todos os derivados do padrão MTZ apresentam potencial de redução menos catódico que ele, supõe-se que superam a resistência por ele sofrida face a atividade giardícida, apresentando-se dessa forma como candidatos fortes contra a giardíase (VALDEZ et al, 2009).

4.2 Perfil dos voltamogramas de VOQ para todos os compostos em meio aprótico

A VOQ é uma das técnicas com melhores limites de detecção, sendo comparáveis aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Tal como a VC, a análise dos parâmetros característicos da VOQ também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003), possibilitando assim a identificação dos sinais eletroquímicos e da reversibilidade ou irreversibilidades dos sistemas.

Na figura 30, apresentam-se os voltamogramas com picos bem definidos associados aos diferentes compostos em análise com a respectiva separação dos componentes de corrente direta, inversa e resultante na frequência de 100 Hz.

Figura 30 - Voltamogramas de onda quadrada dos compostos registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$; $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{DMF} + \text{TBAPF}_6 \text{ } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$); $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, Amplitude de pulso = 50 mV , $f = 100 \text{ s}^{-1}$ com a separação das componentes de corrente direta (—), reversa (—) e resultante (—) (continua)

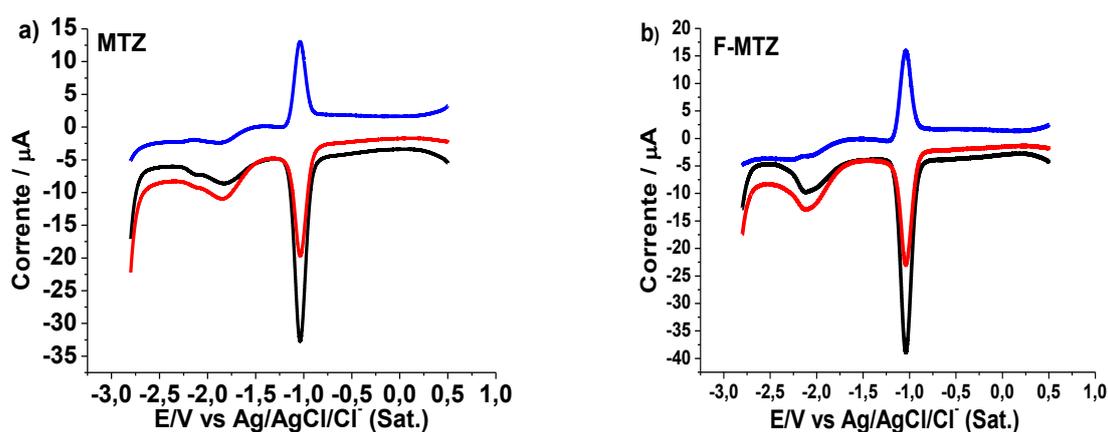
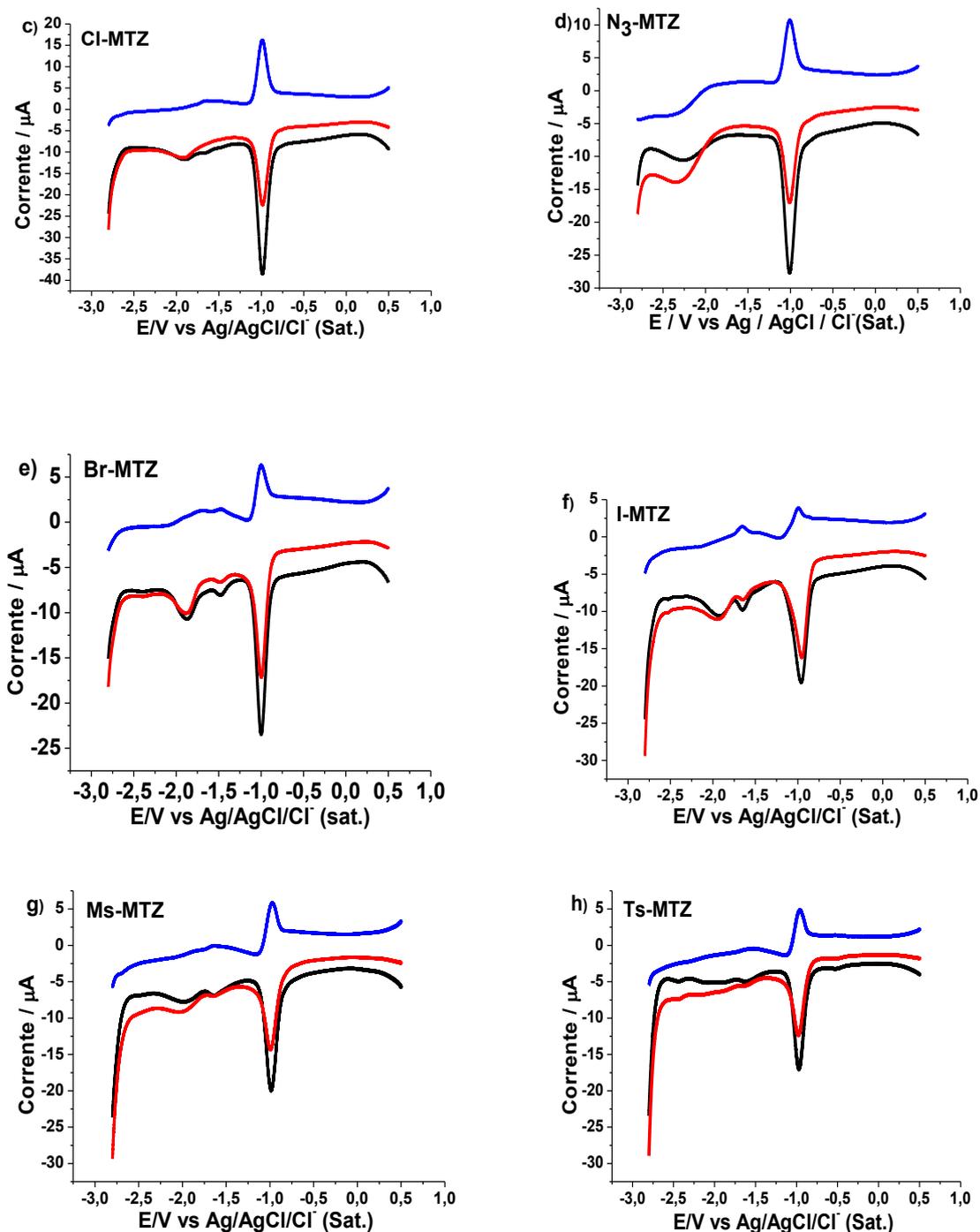


Figura 30 - Voltamogramas de onda quadrada dos compostos registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$; $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{DMF} + \text{TBAPF}_6 \text{ } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$); $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, Amplitude de pulso = 50 mV , $f = 100 \text{ s}^{-1}$ com a separação das componentes de corrente direta (—), reversa (—) e resultante (—) (conclusão)



Fonte: Autor, 2015.

Como pode-se ver, a varredura direta e resultante exibem pelo menos dois picos catódicos (tal como foi verificado na VC), sendo o primeiro mais intenso

enquanto a varredura reversa mostra pelo menos um pico no potencial anódico, sugerindo assim um mecanismo eletródico reversível para os compostos agrupados no conjunto A e quase-reversível para os compostos com grupos fortemente abandonadores o que pode ainda ser sustentado pela não coincidência das correntes resultante e direta, pois, para sistemas irreversíveis há uma coincidência na separação das correntes direta e resultante, enquanto em sistemas reversíveis esta não coincide (CABRAL et al, 2003; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003), assim como o aparecimento das três correntes (direta, inversa e resultante) bem definidas e intensas (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Portanto, a reversibilidade manifesta-se no conjunto A enquanto a quase reversibilidade acontece em todos os compostos do conjunto B, o que sustenta de certa forma a sua evidência em altas velocidades em VC (a partir de $0,200 \text{ V s}^{-1}$) em sistemas que abaixo da velocidade em alusão foram avaliados em irreversíveis.

A feição dos voltamogramas de onda quadrada é quase a mesma para todos embora algumas pequenas diferenças se registrem. Uma característica similar aos compostos com grupos fortemente abandonadores é a presença de três picos de redução na varredura direta assim como na resultante, especificamente para o Br-MTZ; I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ, figuras 30e, f, g e h, respectivamente.

4.3 Estudo do Metronidazol e seus análogos em meio aquoso por voltametria cíclica.

Visando mimetizar as condições biológicas, os estudos do MTZ e seus derivados em meio prótico foram realizados em valor de pH próximo ao fisiológico (tampão fosfato pH 7,2) com 20% de etanol como co-solvente para a solubilização dos compostos que apresentam uma solubilidade reduzida em meio aquoso.

Os voltamogramas para todos os compostos são apresentados na figura 31. Diferentemente do perfil cíclico voltamétrico apresentado pelos compostos em meio aprótico (pelo menos dois picos catódicos, figuras 18 e 24), para o meio prótico, a característica principal é a presença de uma única onda catódica (E_{pc}), irreversível, bem definida num potencial menos catódico (entre -0,408 e -0,899 V) quando comparado com o potencial de redução (E_{plc}) em meio aprótico.

Para além do pico de onda I_c , observa-se ainda em potenciais mais catódicos um ombro identificado como I_{lc} , à exceção dos derivados Ms-MTZ e Ts-

MTZ. Na varredura inversa, é possível verificar também outro ombro anódico, designado por *la* para todos os compostos à exceção do derivado Ms-MTZ.

Figura 31 - Voltamogramas cíclicos do MTZ e seus análogos registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$; $c = 1,0 \text{ mmol}$, meio aquoso etanólico (20%)); $v = 0.100 \text{ V s}^{-1}$ (continua)

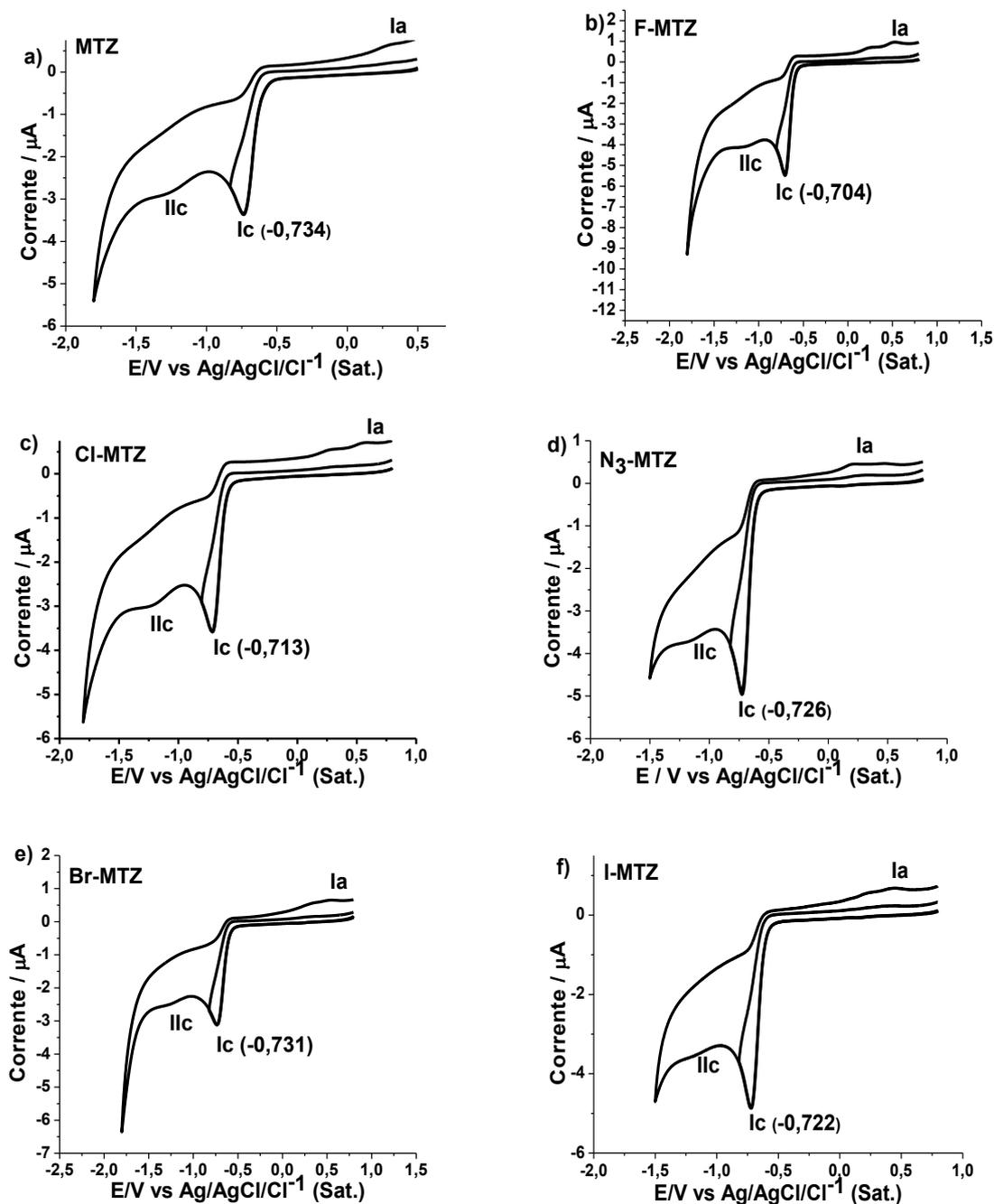
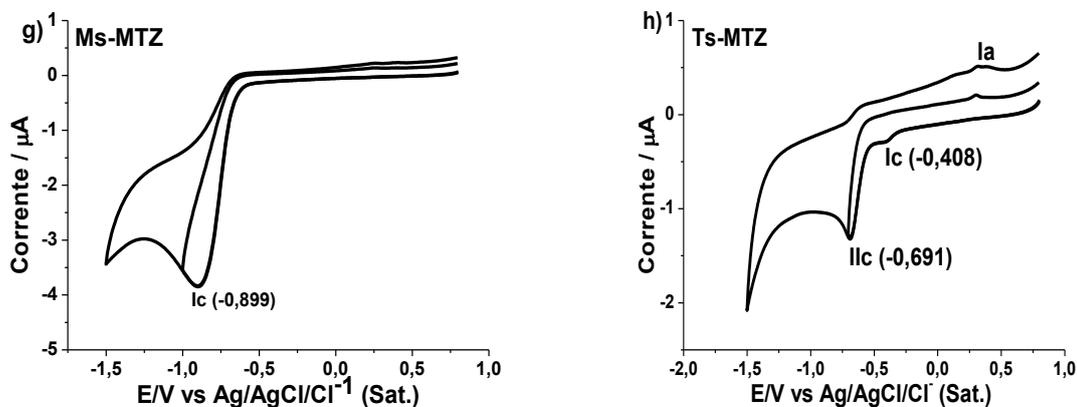


Figura 31 - Voltamogramas cíclicos do MTZ e seus análogos registrados em carbono vítreo ($d = 1 \text{ mm}$; $c = 1,0 \text{ mmol}$, meio aquoso etanólico (20%)); $v = 0.100 \text{ V s}^{-1}$ (conclusão)

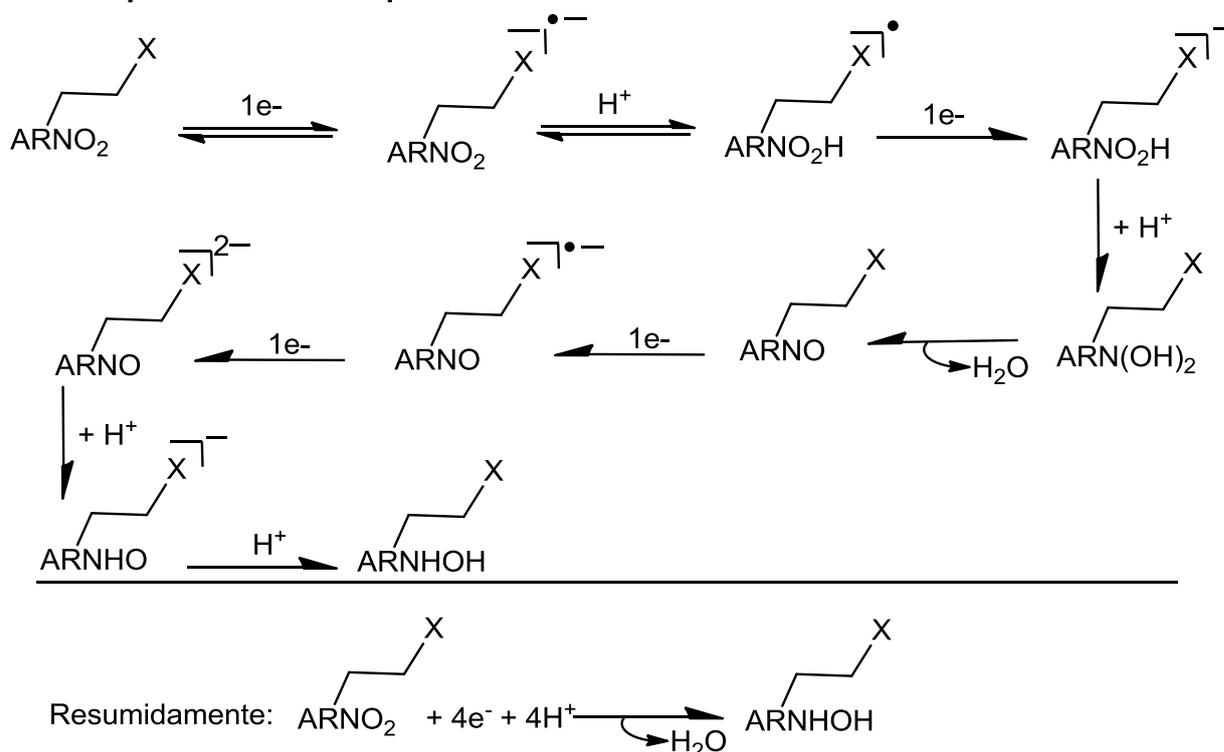


Fonte: Autor, 2015.

O pico de onda Ic corresponde a uma redução característica para nitroaromáticos em soluções aquosas puras que ocorre em uma única etapa, num processo irreversível envolvendo um consumo de $4e^-/4H^+$ que leva à formação da hidroxilamina e liberação da água (ADRES; ECMANN; SMITH, 2013). A hidroxilamina formada provavelmente seja instável uma vez que não há evidência de picos anódicos na varredura reversa. Assim, ao se reduzir, presume-se que sofra reações de fragmentação subsequentes (Oliveira, 2004). O ombro catódico IIc verificado na maioria dos compostos está relacionado com um processo de redução estendida ou redução de produtos de acoplamento, como espécies diméricas, particularmente ao se iniciar o processo com nitroso e sob condições de baixa disponibilidade de prótons. O dímero mais provável é o azoxi, $ArN=N(O)Ar$, formado a partir de qualquer dimerização de $ArNOH$ ou por reação de $ArNO$ e $ArNHOH$ com perda de água (ADRES; ECMANN; SMITH, 2013).

A racionalização mecanística pode ser resumida na figura 32. Esta inclui transferências de elétrons, protonações e desidratação, em um mecanismo clássico ECE.

Figura 32 - Racionalização mecanística da etapa eletroquímica envolvida na redução dos compostos em meio aquoso.

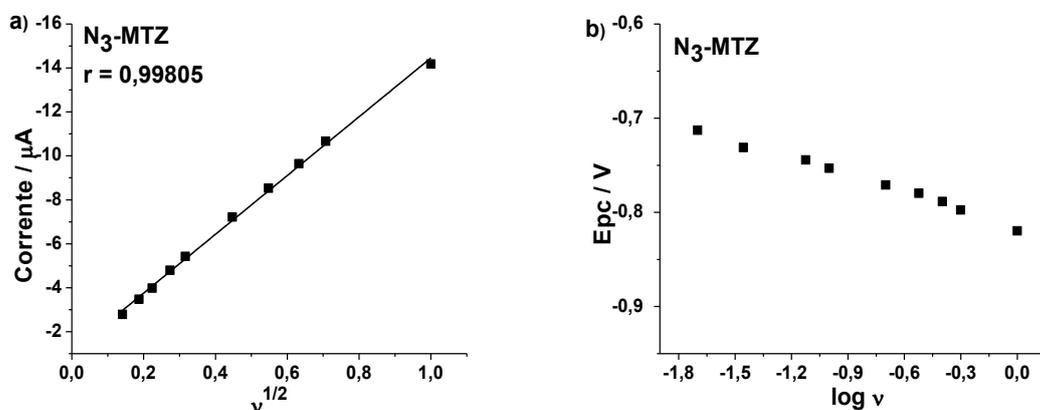


Fonte: ANDRES; ECMANN; SMITH 2013; adaptado.

O estudo eletroquímico do derivado azido ($\text{N}_3\text{-MTZ}$) em meio prótico foi dificultado devido à instabilidade do composto, não sendo possível registrar todos os dados para a análise do processo de transporte de massa assim como a definição mecanística na faixa de velocidade escolhida. No meio aquoso, verificou-se um comportamento contrário, estabilidade com o tempo e em toda a faixa de velocidade estudada, tendo sido possível registrar todos os dados necessários para as posteriores análises.

Assim, na figura 33a apresenta-se o gráfico da relação I_p vs. $v^{1/2}$ que caracteriza o processo de transporte de massa até à superfície do eletrodo como sendo de natureza difusional. Quanto à relação do potencial do pico catódico com o logaritmo da velocidade de varredura (E_p vs. $\log v$), figura 33b, verifica-se uma inclinação um pouco acentuada com o aumento da velocidade, sugerindo um deslocamento do potencial em função da velocidade. O comportamento no estudo das funções da figura 33b foi praticamente o mesmo demonstrado pelos restantes compostos em meio aquoso.

Figura 33 - a) Análise da corrente de pico (I_{pc}) para a primeira onda de redução do derivado azida (N_3 -MTZ) em função da raiz quadrada da velocidade, $v^{1/2}$; b) Gráfico da relação entre o potencial de corrente do pico catódico (E_{pc}) para a primeira onda em função do logaritmo decimal da velocidade, $\log v$ (Tampão fosfato; pH 7,2), $c = 1,0$ mmol; $v = 0,100$ V s⁻¹



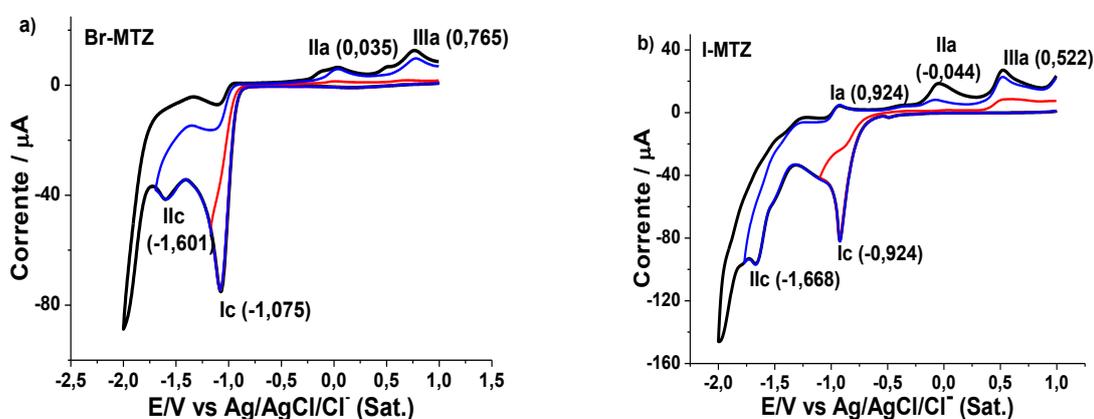
Fonte: Autor, 2015.

4.4 Feição voltamétrica dos derivados Br-MTZ e I-MTZ no eletrodo de ouro

Procurou-se utilizar outros materiais eletródicos de forma a se investigar o comportamento cíclico voltamétrico dos mesmos em meio aprótico.

Como pode ser visto na feição voltamétrica cíclica da figura 34, uma característica típica para a redução de nitroaromáticos também se manifesta no eletrodo de ouro, pois, os voltamogramas exibem dois picos de redução (I_c e II_c), em meio aprótico tal como foi observado usando o carbono vítreo.

Figura 34. Voltamogramas cíclicos de (a) Br-MTZ e (b) I-MTZ registrados em eletrodo de ouro ($d = 3$ mm; $c = 2,0$ mmol L⁻¹; DMF + TBAPF₆ 0,100 mol L⁻¹); $v = 0,100$ V s⁻¹



Fonte: Autor, 2015

Para o derivado bromado (Br-MTZ), algumas características notadas a partir do eletrodo de CV mantiveram-se, como é o caso da primeira onda catódica (Ic) mais intensa que a segunda (IIc) e sem o seu correspondente anódico. Porém, o pico de onda Ic é mais catódico enquanto que o pico IIc é menos catódico quando comparados com os picos Ic e IIc obtidos no eletrodo de CV, respectivamente, figura 24a. Além disso, o pico IIc é muito menos intenso no eletrodo de ouro quando comparado com o IIc registrado a partir de CV.

Na varredura para os potenciais anódicos, diferentemente do observado no CV (ausência de ondas de pico), com o eletrodo de ouro é possível observar-se as ondas IIc e IIIc a uma velocidade de $0,100 \text{ V s}^{-1}$. Em relação ao derivado iodado (I-MTZ), um comportamento bem diferente do observado no CV foi registrado. O pico de onda Ic torna-se menos intenso que o pico de onda IIc no eletrodo de ouro e na varredura para potenciais anódicos registram-se três picos de oxidação, onde o pico Ia revela início da manifestação de quase-reversibilidade para este par. A partir dos cortes fica claro que o pico IIa está relacionado com o segundo processo de redução enquanto o IIIa evidencia uma certa relação mesmo com o primeiro processo de redução.

Embora seja informação insuficiente e preliminar, as constatações encontradas para estes dois compostos nos dois tipos de eletrodos mostram de certa maneira a existência de algumas diferenças quando a massa chega à sua superfície eletroativa. Nitidamente a manifestação das ondas de oxidação para eles e, particularmente para o derivado iodado, que apresenta o primeiro pico de redução menos intenso que o segundo e o indício de quase-reversibilidade do pico Ic na superfície do eletrodo de ouro, podem nos levar a deduzir que o radical formado a partir da primeira redução segue outras etapas eletroquímicas, não interagindo física ou quimicamente com a superfície de ouro, pois, assim acontecendo, após a formação dos radicais na primeira onda catódica para os derivados com grupos fortemente abandonadores, uma transferência de elétrons dissociativa ou quebra eletroquímica sucederia, o que levaria à formação de radicais livres capazes de enxertarem ou ancorarem-se por interação com as ligações duplas na superfície em carbono vítreo (POIZOT et al, 2012; LORCY et al, 2013).

A quebra da ligação C-X representa uma transferência de elétrons adicionados a partir do sistema pi para o sistema sigma ortogonal, sendo que a

mobilidade do halogênio segue a seguinte ordem: $F < Cl < Br < I$ (ÁLVAREZ-GRIERA; GALLARDO; GUIRADO, 2009).

4.5 Estudos da interação dos compostos com o Ácido Desoxirribonucleico

4.5.1 Estudo espectroscópico da interação do Metronidazol com o dsDNA

No campo da Química e Biologia, o estudo sobre a estrutura, ligações específicas, mecanismo e dinâmica das interações das moléculas da dupla cadeia de DNA, assim como com pequenas moléculas que podem reagir com o DNA covalentemente ou não, têm atraído muita atenção, uma vez que essas interações podem influenciar nos processos de replicação e transcrição de DNA in vivo, assim como podem causar mutação de genes que são a fonte de muitas doenças (DEHGHAN; ARVIN; HOSEINPOURFEIZI, 2011).

A espectroscopia de absorção UV-Vis constitui uma das ferramentas mais simples que tem sido usada para a análise das interações entre fármacos e DNA, monitorando as propriedades de absorção (efeitos hipercrômicos ou hipocrômicos (aumento ou diminuição das bandas de absorção, respectivamente) e efeitos batocrômicos (desvios das bandas de absorção para o vermelho ou para o azul) das moléculas do fármaco ou do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

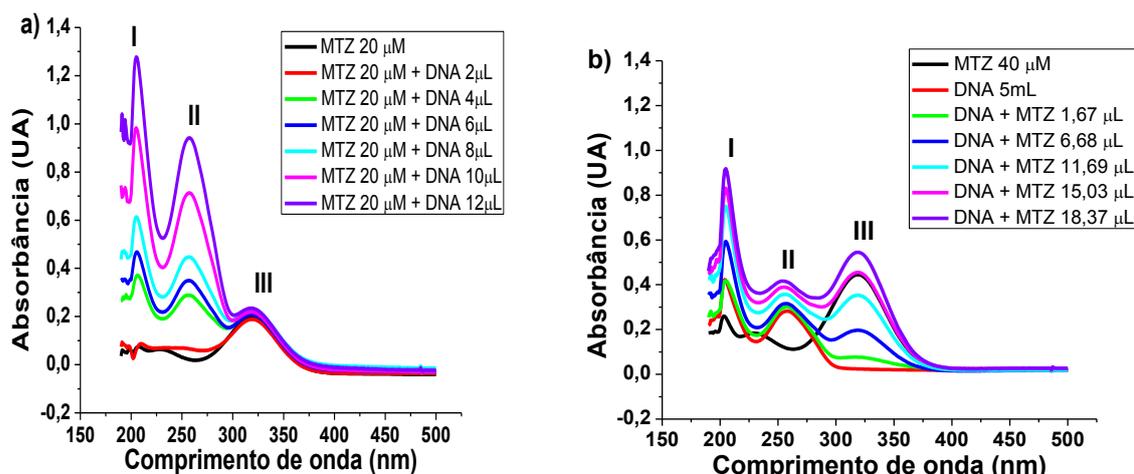
A interação entre o fármaco e o DNA pode ser determinada examinando as mudanças ocorridas nas posições dessas bandas máximas a partir de quando o intercalador estiver livre em solução e depois quando ele estiver ligado ao DNA (complexo fármaco-DNA), pois, normalmente há uma diferença nas bandas de absorção do intercalador e do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; DEHGHAN; ARVIN; HOSEINPOURFEIZI, 2011).

No presente ensaio, procurou-se perceber por espectroscopia no UV-Vis a perturbação que pode ser causada na conformação da cadeia dupla de DNA ao interagir com o fármaco MTZ, em tampão fosfato, pH 7,2 em meio etanólico (20%).

A figura 35 mostra os espectros UV-Vis obtidos interagindo o MTZ com o dsDNA. Na figura 35a, trabalhou-se com uma concentração constante de MTZ, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adicionou-se seis (6) vezes diferentes concentrações de DNA ($1,6 \times 10^{-6}$, $4,5 \times 10^{-6}$; $5,7 \times 10^{-6}$; $6,8 \times 10^{-5}$; $1,1 \times 10^{-4}$ e $1,5 \times 10^{-4}$) a partir da solução estoque de DNA a $6,0 \text{ mg/ } \frac{1}{2} \text{ mL}$. Antes da leitura esperava-se 20 minutos para permitir um

contato significativo entre os reagentes. Na figura 35b, fixou-se a concentração de DNA e fez-se uma média de doze (12) adições de concentrações do MTZ (a baixas, equivalentes e um pouco superiores) para uma concentração máxima de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$

Figura 35 - Espectros de absorção UV-Vis da interação do MTZ com o DNA: a) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTZ na presença de diferentes concentrações de DNA (2 -12 μL , 10 mg/mL); b) 5 μL de DNA (10 mg/mL) na presença de diferentes concentrações de MTZ. Solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,2



Fonte: Autor, 2015.

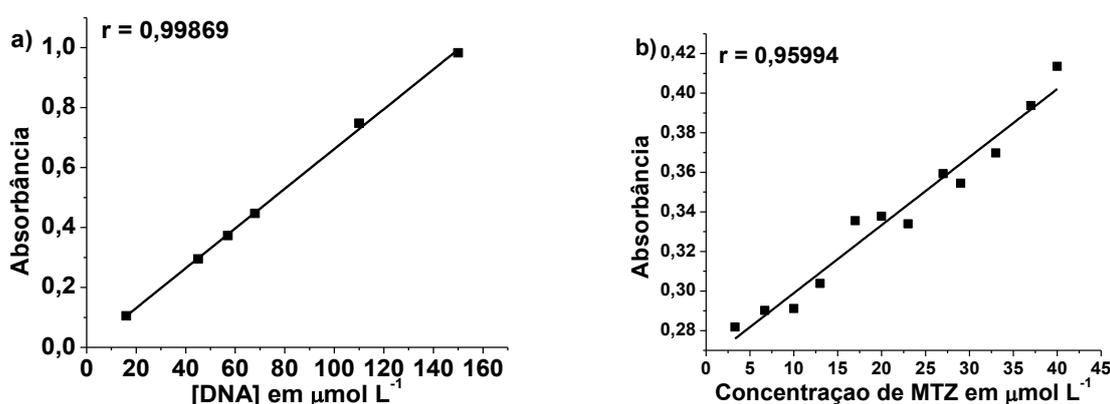
Analisando os espectros da figura 35a, a primeira adição do DNA não mostrou nenhum sinal relativo ao DNA. Porém, a partir da segunda adição aparecem as bandas típicas de DNA, que aumentam de intensidade, com o aumento da concentração do mesmo (efeitos hipercrômicos) e em relação à banda no espectro do MTZ (III), alteração muito sutil se verifica. A curva de calibração encontra-se na figura 36a.

A figura 35b mostra espectros obtidos invertendo-se o procedimento experimental, no caso manteve-se constante a concentração de DNA e foi-se adicionando o MTZ. Como sempre, o DNA mostra duas bandas bem definidas nos mesmos comprimentos de onda (205 e 258 nm), como consequência das transições eletrônicas dos grupos cromóforos das purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina e timina), que se intensificam, com o aumento da concentração de MTZ (bandas I e II). O MTZ mostra três sinais, mas apenas uma banda torna-se evidente (banda III a 319 nm) que aumenta de intensidade com o aumento da concentração deste. Inicialmente, com a adição do MTZ pode-se perceber a ocorrência de efeitos hipercrômicos, devido ao aumento da intensidade das bandas (I e II), porém, uma

vez que a banda do MTZ (III) também aumenta, e em alguns casos, esse aumento não é proporcional embora sejam adicionadas quantidades equivalentes fica uma dúvida em inferir se há ou não interação entre ambos (curva de calibração na figura 36b).

Quando o fármaco interage com o DNA por intercalação, fenômenos de hipocromismo e batocromismo (desvios para o vermelho) geralmente acontecem (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Uma vez que os espectros da figura 35 não manifestam nem hipocromismo e nem batocromismo o MTZ não intercala com o DNA. Porém, dado que nos mesmos espectros são observados efeitos de hiperchromismo que refletem mudanças na conformação e estrutura de DNA após sua interação com o MTZ, significa que provavelmente pequenas interações ocorrem entre o MTZ e o DNA, resultantes de forças eletrostáticas, e ainda, o MTZ possivelmente funcione como um agente desnaturante do DNA, deixando as bases soltas, daí o aumento da absorbância (caso específico da figura 35b). Sem significativas mudanças no perfil espectral, efeitos hiper-crômicos ou hipocrômicos são observados quando apenas se verificam interações fracas (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Figura 36 - Gráficos da interação do MTZ com o DNA. a) Adição de quantidades crescentes de dsDNA em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTZ. b) Adição de quantidades crescentes MTZ em 5mg mol^{-1} de dsDNA. Dados obtidos via espectroscopia UV-Vis. Solução de tampão fosfato ($0,1 \text{mol L}^{-1}$), pH 7,2.



Fonte: Autor, 2015

4.5.2 Estudo da interação dos compostos com o biossensor de DNA utilizando VPD.

As técnicas eletroquímicas (particularmente biossensores eletroquímicos de DNA) têm se mostrado como ferramentas úteis para a investigação rápida e de baixo custo dos efeitos das diferentes fontes endógenas e exógenas responsáveis pelos danos oxidativos do DNA tanto quanto dos mecanismos pelos quais este interage com os fármacos (BRETT et al, 2004).

Jiang e Lin (2006) investigaram por métodos voltamétricos (voltametria cíclica e de pulso diferencial) a interação do MTZ frente ao DNA, tendo verificado uma apreciável atração eletrostática a partir dos deslocamentos no pico de potencial para valores mais negativos, assim como mudanças na corrente de pico.

No presente ensaio, investigou-se a interação das oito amostras em destaque (MTZ e seus análogos – tabela 4) com o DNA, produzindo-se um filme na superfície de carbono vítreo ($d = 3 \text{ mm}$) a partir do gel de dsDNA ($10 \mu\text{L}$ a $6 \text{ mg}/1/2\text{ml}$) usando-se como técnica a voltametria de pulso diferencial em tampão acetato com 20% de etanol, em valor de pH de 4,5.

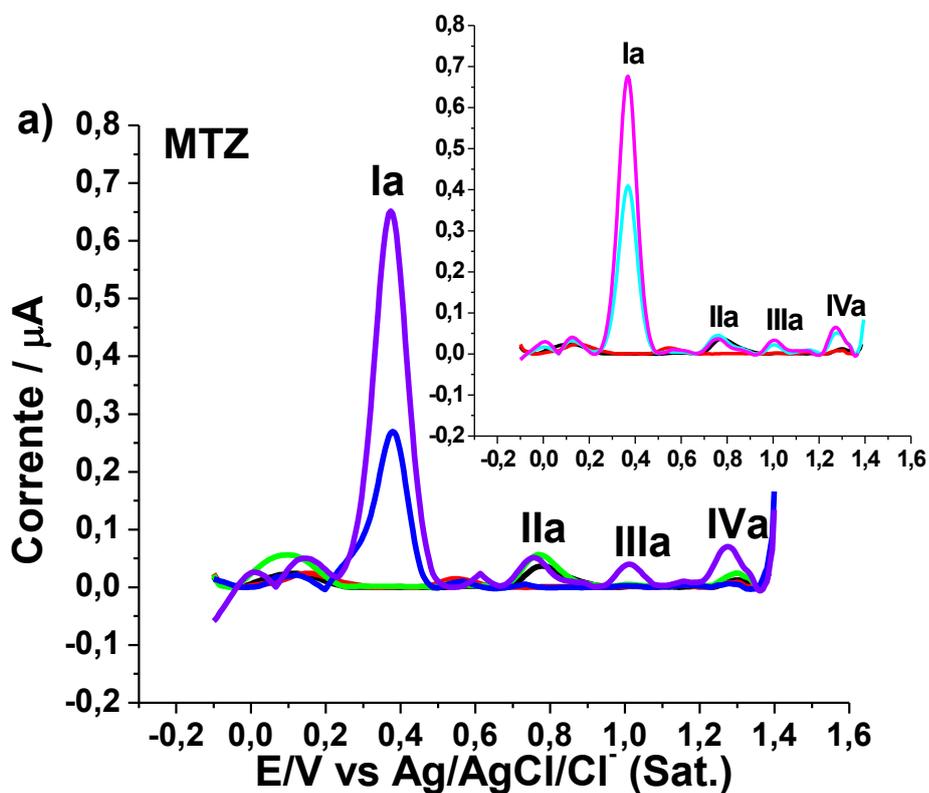
Os voltamogramas de pulso diferencial registrados na superfície de CV e filme de dsDNA em carbono vítreo para uma concentração de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada composto, mostram quatro picos evidentes de oxidação designados por Ia, IIa, IIIa e IVa, para as condições experimentais descritas, figura 37 a-h. Para todos os compostos, o pico Ia ($+0,35$ a $+0,37 \text{ V}$) não é verificado no voltamograma em preto, vermelho e verde, nos quais não se fez a aplicação do potencial (potenciais aplicados na tabela 9), mostrando que este pico de oxidação depende de uma pré-redução condicionada dos compostos e provavelmente seja o derivado nitroso devido à oxidação da hidroxilamina, principal produto de redução de nitroaromáticos em meio prótico (ADRES; ECMANN; SMITH, 2013; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; CAVALCANTI et al, 2004).

Tabela 9 - Parâmetros eletroquímicos para os compostos (potenciais aplicados) registrados por VPD. Eletrodo de Carbono Vítreo ($d = 3 \text{ mm}$), E/V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (sat.), $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV .

Composto	MTZ	F-MTZ	Cl-MTZ	N ₃ -MTZ	Br-MTZ	I-MTZ	Ms-MTZ	Ts-MTZ
E (V)	-0,591	-0,610	-0,586	-0,576	-0,591	-0,566	-0,635	-0,537

Fonte: Autor, 2015

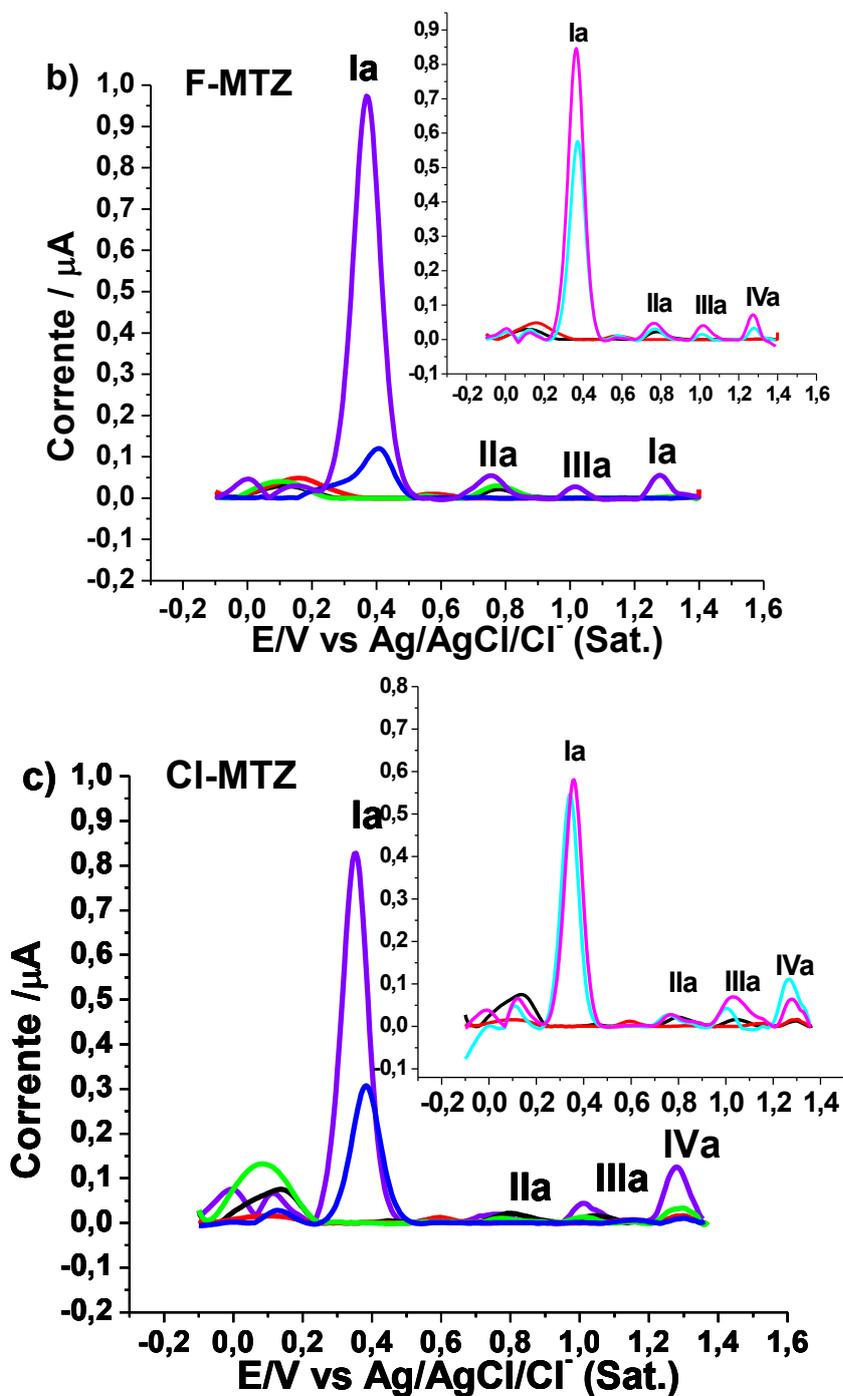
Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—); composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP⁸ (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP⁹ (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—). Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (continua)



⁸ Sem aplicação de potencial

⁹ Com aplicação de potencial

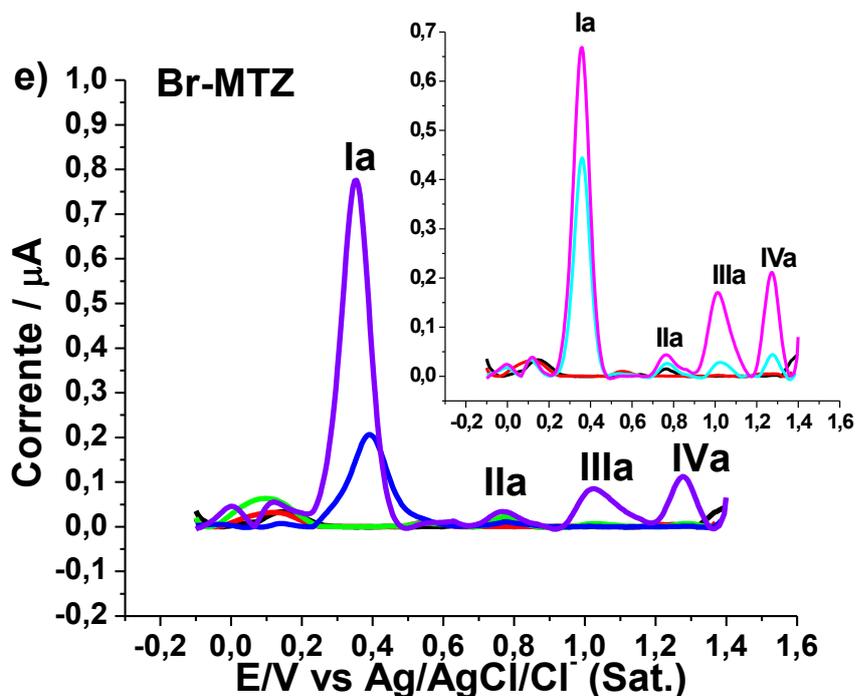
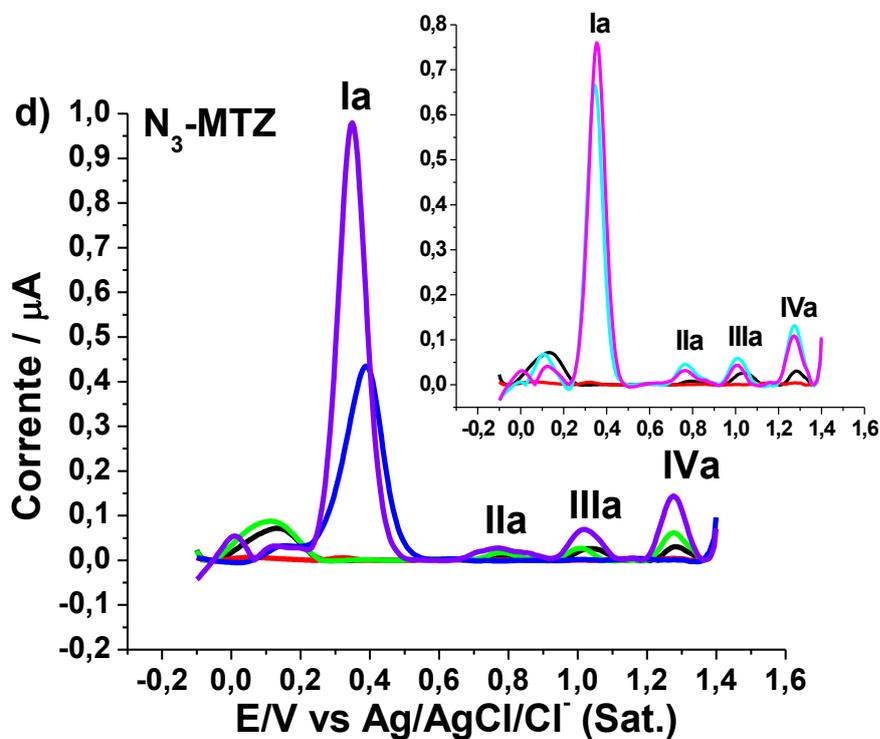
Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—); composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP¹⁰ (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP¹¹ (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—) Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (continuação)



¹⁰ Sem aplicação de potencial

¹¹ Com aplicação de potencial

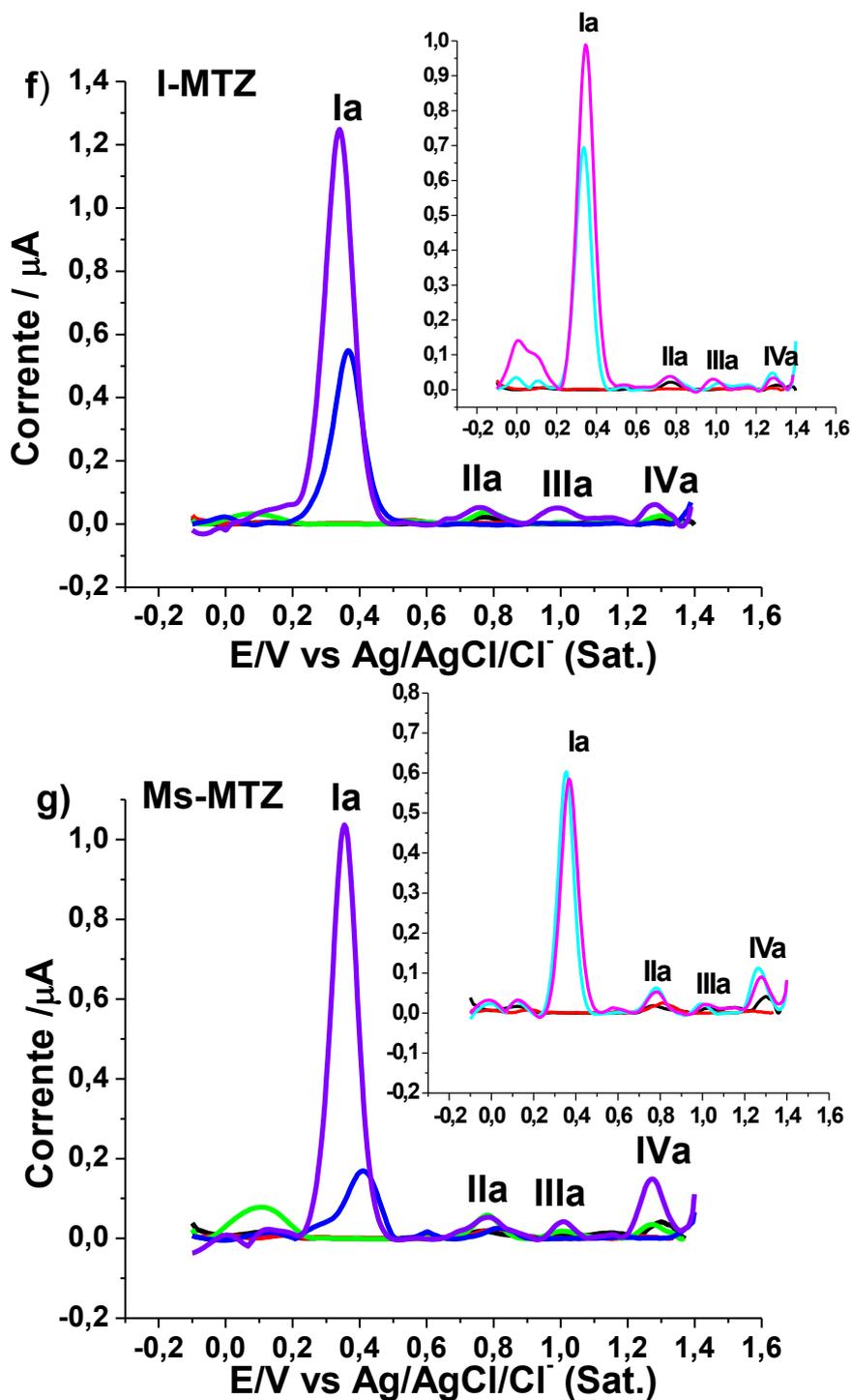
Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—); composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP¹² (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP¹³ (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—) Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (continuação)



¹² Sem aplicação de potencial

¹³ Com aplicação de potencial

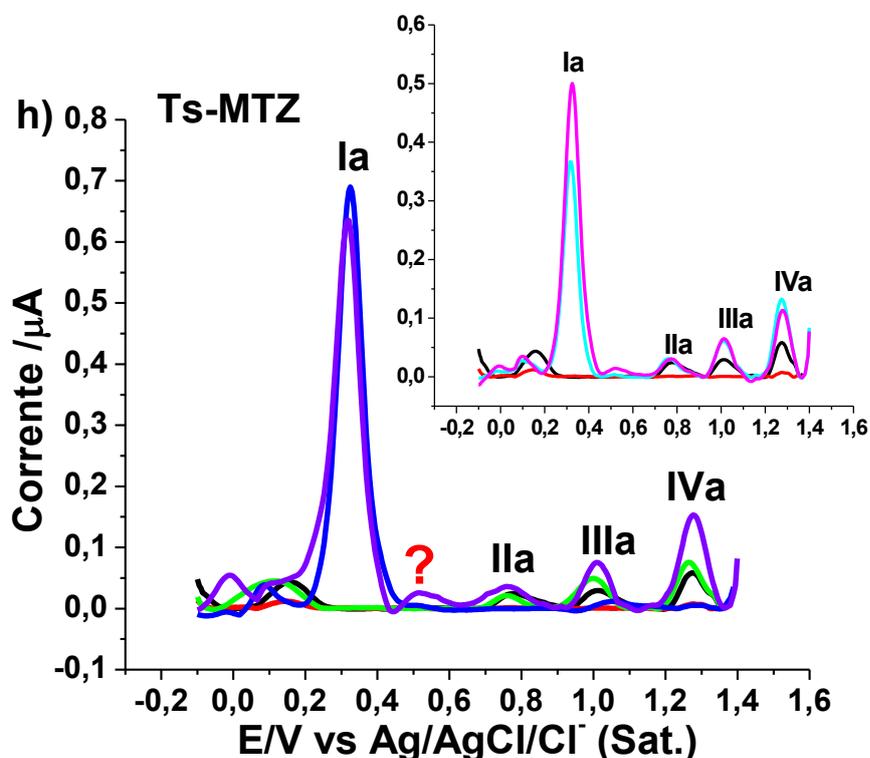
Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—); composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP¹⁴ (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP¹⁵ (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—) Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (continuação)



¹⁴ Sem aplicação de potencial

¹⁵ Com aplicação de potencial

Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. Filme de dsDNA (—); composto em ECV (—); composto em dsDNA/15 minutos de interação/SAP¹⁶ (—); composto em ECV/120 s de interação/CAP¹⁷ (—); composto em dsDNA/ depois de 10 ciclos em VC/SAP (—) Na inserção: composto em dsDNA/120 s de interação/CAP (—); composto em dsDNA/240 s de interação/CAP (—) $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (conclusão)



Fonte: Autor, 2015

O pico de onda IIa ($E \sim +0,76\text{V}$) não está presente nos voltamogramas em vermelho e azul, mostrando que ele é específico de DNA, pois, os voltamogramas em destaque foram registrados em ECV. Em relação ao seu comportamento, ele sofre ligeiras oscilações, onde na maioria das amostras tem uma tendência a aumentar, mostrando até certo ponto uma possível interação com os mesmos.

A presença dos picos de onda IIIa e IVa só é possível no filme de dsDNA, e somente quando a varredura é precedida por um pré-condicionamento da amostra, ou seja, após a aplicação do potencial com tempos diferentes (120 s, voltamograma ciano e 240 s voltamograma magenta) e também quando a oxidação é antecedida por uma redução cíclica (10 ciclos) da amostra (voltamograma violeta). Estes dois picos vão apresentar um comportamento diferenciado em função do tempo de condicionamento assim como em relação à substância em análise.

¹⁶ Sem aplicação de potencial

¹⁷ Com aplicação de potencial

Quando a amostra é deixada em contato com o filme de dsDNA por um período de 15 minutos (voltamograma em verde) os picos IIIa e IVa são pouco perceptíveis, à exceção dos derivados Ts-MTZ e N₃-MTZ, figuras 37h e 37d, respectivamente, onde os dois picos mostram-se evidentes. Em relação aos derivados Ms-MTZ, Cl-MTZ e o padrão MTZ, figuras 37g, 37c e 37a, respectivamente, apenas o pico IVa é evidente. Este comportamento pode estar relacionado com as características de cada composto em solução (influência de cada grupo substituinte assim como com a estabilidade). Considerando todas estas constatações fica claro que em quase todos os compostos por simples contato (sem aplicação de potencial) pouco integram com o filme de dsDNA.

Tomando como base de análise o tempo de condicionamento na aplicação de potencial, sucede o seguinte:

➤ Para o MTZ, figura 37a, a intensidade dos picos IIIa e IVa não sofre influência do tempo de condicionamento, ou seja, mantém-se constante, enquanto para os análogos F-MTZ e Br-MTZ, figuras 37b e 37e, a intensidade dos picos IIIa e IVa aumenta com o aumento do tempo de condicionamento, sendo máxima na oxidação realizada após 240 s de condicionamento, à exceção do padrão MTZ, onde a intensidade máxima do pico de oxidação registrou-se após 10 ciclos da amostra em VC. Isto leva a entender que quanto maior o tempo de condicionamento, maior será a formação da espécie eletroativa e maior será a sua interação com as bases de DNA.

➤ Em relação aos derivados, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ, figuras, 37f, 37g e 37h, respectivamente, verifica-se que a intensidade do pico IIIa mantém se constante com o aumento do tempo de condicionamento enquanto para o pico IVa esta vai diminuindo com o tempo de condicionamento. Com o aumento de tempo de condicionamento, a espécie eletroativa formada interage de modo semelhante com a base responsável pelo pico de oxidação III (intensidade de pico sem alteração), entretanto apresenta uma menor interação com a base responsável pelo pico de oxidação IVa (diminuição da intensidade do pico). Em relação ao derivado Cl-MTZ, a espécie eletroativa formada interage de forma mais significativa com a base responsável pelo pico de oxidação IIIa e menos com o pico de oxidação IVa com o aumento de tempo, figura 37c.

➤ Finalmente, para o derivado N₃-MTZ, os picos IIIa e IVa foram superiores com 120 s que com 240 s de condicionamento, indicando que a espécie

eletroativa formada pode ser instável, perdendo-se em maior tempo de condicionamento, daí, ocorrendo menor interação com as bases.

Os picos de oxidação IIIa e IVa foram superiores na oxidação efetuada após 10 ciclos de VC, indicando uma maior formação e concentração da espécie eletroativa que interage com as bases de DNA. É sabido que a redução do padrão MTZ assim como seus derivados geram espécies radicalares e protonadas que, conforme os resultados da figura 37 atacam o filme da dupla hélice de DNA sob superfície de carbono vítreo, provocando um contato com as bases, provavelmente com a guanina (EpIIIa $\sim +1,01$) e com a adenina (EpIVa $\sim + 1,27$) em tampão fosfato pH 4,5.

Um sinal anódico é verificado em Ep²a (+0,54 V para Ts-MTZ, figura 37h), indicando outros produtos de oxidação originados pela interação dos produtos de redução desses compostos com o dsDNA. Pela região do potencial, este pico possivelmente esteja relacionado com a oxidação da 8-oxoguanina (DISCULESCEU et al 2005).

A partir dos resultados encontrados no estudo da interação do padrão MTZ e seus derivados com o filme de dsDNA constata-se que eles pouco interagem diretamente com o DNA, porém, as espécies altamente eletrofílicas geradas após a aplicação do potencial podem interagir com os sítios nucleófilos das bases de DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011) provocando dessa forma danos ao DNA.

O mecanismo da ação biológica de nitroimidazóis depende da redução do grupo nitro, o que leva à espécie intermediária que interage com o DNA, oxidando-o e liberando fosfato de timidina, causando assim uma lesão caracterizada por desestabilização e danos à dupla hélice. Estudos por polarografia de corrente contínua mostraram que o potencial de meia-onda de MTZ se altera na presença de bases de DNA, tais como adenina, guanina e citosina em menor extensão. Estas bases interagem facilmente com a hidroxilamina intermediária gerada durante a redução de MTZ (BRETT et al, 1997).

4.5.3 Estudo da interação dos compostos com sensor de ssDNA utilizando VPD.

Visando a aquisição de mais dados sobre a reatividade dos compostos em estudo face ao DNA, a interação foi também avaliada por VPD a partir da solução de ssDNA em tampão acetato, pH 4.5 com 20% de etanol. Os voltamogramas de pulso diferencial para todos os compostos estão representados na figura 38. Os resultados mostram que os mesmos interagem diretamente com a solução de ssDNA, sendo que a mesma, tal como no filme de dsDNA varia de composto para composto.

Figura 38 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos interagindo com a solução de ssDNA em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. ssDNA (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4}$ /CAP (—); $v = 5$ mV s⁻¹. Amplitude de pulso 50 mV. (continua)

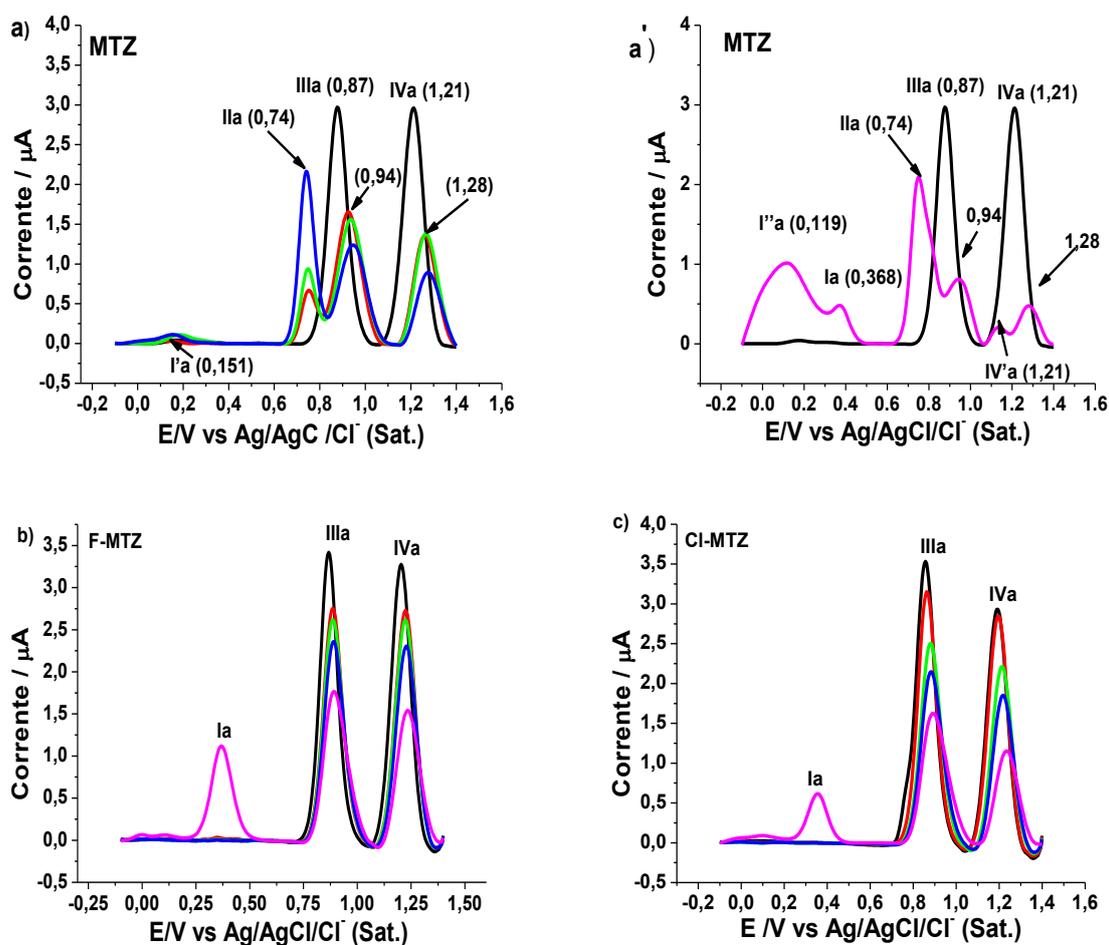
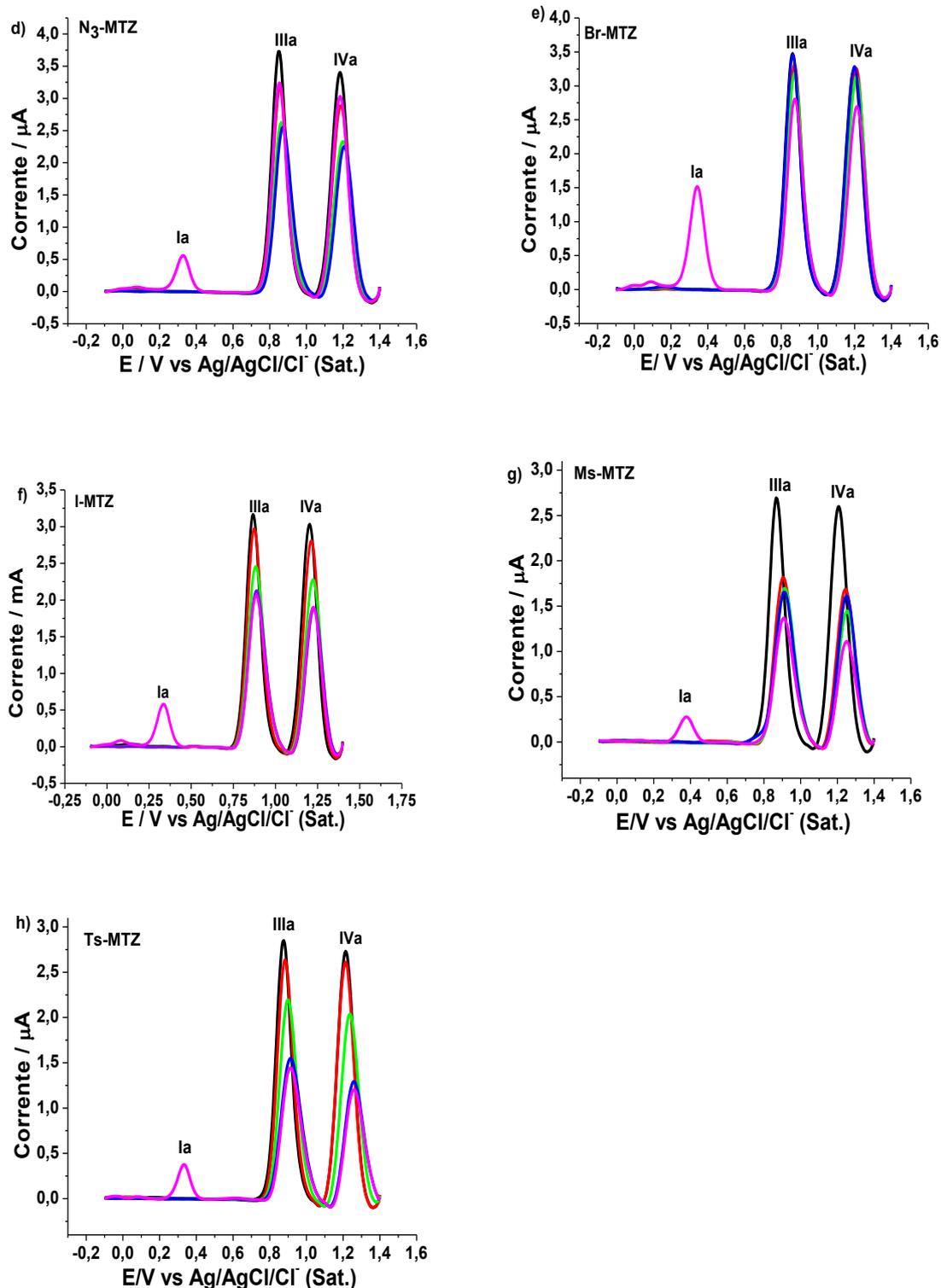


Figura 38 - Voltamogramas de pulso diferencial dos diferentes compostos interagindo com a solução de ssDNA em tampão acetato, pH 4,5 a 20% de etanol. ssDNA (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—); ssDNA + composto a $1,0 \times 10^{-4} / \text{CAP}$ (—); $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso 50 mV. (conclusão)



Como pode ser observado a partir dos resultados da figura 38a e a', o padrão MTZ mostra uma interação mais significativa, chegando a formar outros produtos oxidáveis em comparação aos seus análogos. Ele mostra quatro picos anódicos bem definidos designados por Ia, IIa, IIIa e IVa, para além dos picos líneas I'a, I''a e IV'a. A presença, intensidade e o deslocamento desses picos depende da concentração do MTZ assim como da aplicação do potencial de redução. Os picos anódicos IIIa (+0,87 V) e IVa (+1,21 V) são típicos do ssDNA antes da adição da amostra, correspondendo a guanina e adenina, respectivamente.

Quando se adiciona a amostra, ocorre a diminuição e o deslocamento dos mesmos e esta diminuição aumenta com o aumento da concentração (existe uma sobreposição entre os voltamogramas nas concentrações de $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o pico IIIa desloca-se para +0,94 V enquanto o IVa para +1,28 V, indicando uma clara interação com as bases expostas do ssDNA. Por outro lado, surge o pico IIa (+0,74 V) que aumenta com o aumento da concentração do MTZ e atinge o máximo com o aumento da concentração e aplicação do potencial, este pico, provavelmente esteja relacionado com um produto de oxidação das bases de DNA. No potencial anódico +0,38 V aparece o pico de onda Ia, que se evidencia num potencial similar em quase todos os compostos, mesmo na análise feita no dsDNA, indicando a presença da hidroxilamina. A adição da amostra na solução de ssDNA provoca ainda o aparecimento dum sinal pouco apreciável (I'a = +0,151 V) com tendência a intensificar-se quando se aumenta a concentração. Aplicando-se o potencial, para além da diminuição da intensidade de corrente, surgem ainda os picos líneas I''a (+0,119 V) e IV'a (+1,13 V) que indicam outros produtos oxidáveis resultantes da interação dos radicais da redução do MTZ com o ssDNA.

Para os restantes compostos, da figura 38b-h, três (3) picos anódicos são característicos em todos os voltamogramas, sendo eles *E*pIa (+0,35 V), *E*pIIIa (+0,89 V) e *E*pIVa (+1,23 V), atribuídos à hidroxilamina, guanina e adenina, respectivamente. Uma característica comum entre eles é variação sutil nos potenciais de pico e um ligeiro deslocamento do potencial do pico para potenciais mais positivos em comparação com o branco ssDNA. Para o análogo CI-MTZ (figura 38c) houve diminuição significativa e proporcional da intensidade de pico com o aumento da concentração e aplicação do potencial de redução, indicando uma interação significativa com a solução de ssDNA.

Com os derivados F-MTZ, N₃-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ não se verificou uma variação proporcional na diminuição da intensidade dos picos em função do aumento da concentração e aplicação do potencial, sendo que em alguns casos ocorre sobreposição dos voltamogramas. Particularmente ao N₃-MTZ, figura 38d, quando se aplicou o potencial, a intensidade da corrente aumenta drasticamente (esperava-se que diminuísse ainda mais), como se a cadeia simples de ssDNA estivesse sofrendo outros rompimentos e formando os respectivos nucleotídeos. Entretanto, dado que há diminuição da intensidade da corrente com a adição do composto na solução ssDNA, assim como ligeiro deslocamento do pico para potenciais mais anódicos, ocorre interação desses compostos com as bases de ssDNA. Uma diminuição e deslocamento do pico menos apreciáveis foram verificadas no composto Br-MTZ após sua adição na solução de ssDNA (figura 38e), mesmo quando se aplicou o potencial de redução, indicando uma interação sutil, contrariamente ao seu comportamento face ao dsDNA, onde mostrou-se mais a intercalar que os outros compostos.

A partir dos resultados da interação dos 5-nitroimidazóis estudados com o dsDNA e ssDNA, de modo geral, a intercalação provavelmente seja o modo de ação molecular dos mesmos e/ou dos seus intermediários reativos. A intercalação leva a mudanças estruturais no DNA. Pode ocorrer a estabilização, alongamento, endurecimento e desenrolamento da dupla hélice. Estas modificações estruturais podem levar a alterações funcionais, conduzindo frequentemente à inibição de processos da transcrição, de reparação e de replicação de DNA, podendo dessa forma considerar-se estes 5-nitroimidazóis potentes mutagênicos. É possível também ocorrer interferências nas interações normais DNA-proteínas, tais como topoisomerasas, bem como os efeitos sobre a função e DNA mitocondrial (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; MUKHERJEE et al, 2008).

Por outro lado, os resultados da interação dos 5-nitroimidazóis com a solução de ssDNA mostram que ocorre uma interação significativa, mesmo sem a aplicação do potencial de redução dos mesmos. Sugere-se que, apesar de não terem sido feitos experimentos especificamente com RNA, os resultados podem indicar, devido à similaridade estrutural, uma possibilidade de interferência em processos vitais relacionados ao RNA, através da ligação de RNA à dupla hélice de DNA para formar estruturas de DNA de tripla hélice ou de hibridização de RNA (sequência de ligação específica) ao DNA exposto de fita simples formando híbridos

RNA-DNA que podem interferir com a atividade transcricional (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

4.6 Avaliações da atividade giardicida

É sabido a partir dos dados publicados na literatura (TOWMSON et al, 1994; LIVERTOUX; LAGRANGE; MINN, 1996; CAVALCANTI et al, 2004; BUSATTI et al, 2007) que há uma correlação significativa entre o potencial da primeira redução dos nitroaromáticos (fármacos e candidatos a fármacos) com a sua atividade biológica. Assim, é possível tomar parâmetros como potencial de redução para a previsão da atividade biológica de nitroaromáticos.

Dados sobre os valores de IC_{50} (tabela 10) publicados recentemente, referentes à avaliação da atividade giardicida do padrão MTZ e alguns dos seus análogos em trofozoítos, in vivo utilizando gerbilos (*Meriones unguiculatus*) como um modelo experimental estabelecem mais uma vez presumível correlação entre o E_{pc} e a atividade antimicrobiana, onde os derivados apresentam maior atividade giardicida quando comparados ao padrão MTZ (BUSATTI et al, 2013). Na seção 4.1.2.3 estabeleceu-se a ordem de facilidade de redução dos compostos que mostra uma maior tendência favorável aos análogos que o padrão MTZ. Embora os dados da tabela 10 não mostrem a mesma sequência apresentada na ordem da facilidade de redução, tabela 11 (há uma pequena alteração na ordem dos compostos por conta de pequenas diferenças nos potenciais de redução), fica claro que os potenciais de redução menos catódicos apresentam uma atividade giardicida maior.

Tabela 10 - Valores de IC_{50} sobre avaliação da atividade giardicida do padrão MTZ e alguns dos seus análogos em trofozoítos, in vivo, utilizando gerbilos (*Meriones unguiculatus*) como um modelo experimental (BUSATTI et al, 2013).

Composto	MTZ	Ms-MTZ	N ₃ -MTZ	I-MTZ	Br-MTZ
IC_{50}	1.96±0.13	0.69±0.05	0.70 ± 0.16	0.40 ± 0.03	0.28 ± 0.04

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 11 – Ordem de facilidade de redução dos compostos definida pelos potenciais do primeiro pico catódico.

Comp.	I-MTZ	CI-MTZ	Ts-MTZ	Br-MTZ	Ms-MTZ	N ₃ -MTZ	F-MTZ	MTZ
- E_{pc} (V)	0,982	1,031	1,039	1,044	1,048	1,053	1,079	1,097

Fonte: Autor, 2013.

Dados de correlação anteriormente apresentados, desta vez em relação a *Helicobacter pylori* mostraram tendência similar: compostos mais facilmente redutíveis, especificamente derivados iodado, bromado e sal de amônio foram mais ativos (contra estipes resistentes ao MTZ), mostrando assim a importância da ativação redutiva na atividade biológica (CAVALCANTI et al, 2004).

5 CONCLUSÕES

À exceção do derivado Ts-MTZ, o processo de redução dos compostos em meio aprótico caracterizou-se por duas ondas, sendo a primeira onda de natureza reversível para MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ, enquanto os derivados com grupo fortemente abandonador apresentaram uma natureza irreversível.

Em meio aquoso, a redução de todos os 5-nitroimidazóis é praticamente da mesma natureza, típica de nitroaromáticos em soluções aquosas, caracterizando-se por uma onda bem definida em processo irreversível envolvendo um consumo de $4e^-/4H^+$ que leva à formação da hidroxilamina. O mecanismo genérico para a redução destes compostos nos dois meios (aprótico e prótico) é ECE:

- ✓ MTZ, F-MTZ, Cl-MTZ e N₃-MTZ: E_rC_iE_i (transferências de elétrons e protonações);
- ✓ Br-MTZ, I-MTZ, Ms-MTZ e Ts-MTZ: E_iC_iE_i (transferências de elétrons, dissociação e dimerização).

A facilidade de redução dos oito compostos em meio aprótico na superfície de carbono vítreo (d = 1 mm), representada pelo potencial de redução da primeira onda (E_{p1}), segue a seguinte ordem: I-MTZ > Cl-MTZ > Ts-MTZ > Br-MTZ > Ms-MTZ > N₃-MTZ > F-MTZ > MTZ. Esta ordem mostra que os derivados com grupos fortemente abandonadores tem tendência de se reduzirem mais facilmente (valores de potenciais menos catódicos) e pode ser correlacionada com a atividade giardicida dado que os compostos com potenciais menos catódicos mostram-se mais eficientes contra a giardíase.

Resultados obtidos por espectroscopia no UV-Vis em concentração variável e fixa de DNA, demonstraram que o MTZ interage, apenas sutilmente, com o DNA;

Os ensaios realizados, por VPD, indicaram que a partir de simples contato dos compostos com o dsDNA não há interação, porém, com um pré-condicionamento (aplicação de potencial de redução por VC), seguido de oxidação, todos demonstram interação com o dsDNA.

Para a solução de ssDNA o processo é contrário, mostrando uma interação dependente da concentração do composto adicionado mesmo sem o pré-condicionamento, embora na maioria dos casos quando se aplica o potencial, ocorra o aumento da interação dos compostos com o ssDNA.

A partir das características mostradas pelos voltamogramas de pulso diferencial quer em dsDNA, quer em ssDNA (deslocamento do pico de potencial para valores mais positivos), os compostos interagem por intercalação com as bases do DNA, uma ação sugerindo que o DNA pode ser um alvo potencial no mecanismo de ação molecular destes compostos.

6 PERSPECTIVAS

Caracterizar os picos de onda não clarificados durante a investigação eletroquímica da interação dos compostos com o dsDNA e ssDNA para permitir uma melhor identificação e descrição do modo de ação molecular dos compostos frente ao DNA;

Realizar estudos espectroeletroquímicos de todos os compostos para a elucidação e monitoramento dos processos eletroquímicos decorrentes na superfície do eletrodo na faixa de potencial considerada;

Ampliar o campo eletródico na investigação eletroquímica destes compostos, no sentido de compreender e solidificar o conhecimento eletroquímico dos mesmos nos meios aprótico e prótico, pois, dado o comportamento diferenciado dos substituintes nestes compostos, é possível que se registrem perfis voltamétricos diferenciados dependendo do material eletródico de trabalho escolhido;

Quantificar a percentagem da interação dos compostos com a solução de ssDNA em função da concentração adicionada dos mesmos, de modo a avaliar a relação grau de interação vs concentração de cada um deles.

Fazer eletrólises em ausência e presença de DNA, procurando-se isolar e caracterizar os produtos formados.

Usar dsDNA para monitoramento de nitroaromáticos, uma vez que ocorre pré-concentração, com intensificação dos sinais, pois, esta pode ser uma técnica para a produção e concentração da hidroxilamina.

Avaliar se há interação destes compostos com o DNA da *Giardia*.

REFERÊNCIAS

ABREU, F.C; GOULART M.O.F. BRETT, A.M. Oliveira. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 17, p.913-919, 2002.

AHMED T. Synthesis of new compounds derived from metronidazole and amino acids and their esters as antiparasitic agentes. **Medical Chemical Research**, n. 21, p.1700-1707, 2012.

ÁLVAREZ-GRIERA, Laura; GALLARDO, Iluminada; GUIRADO, Gonzalo. Estimation of nitrobenzyl radicals reduction potential using spectro-electrochemical techniques. **Electrochimica Acta**, n. 54, p. 5098-5108, 2009.

ANDRES, Theresa; ECMANN, Lars; SMITH Diane K. Voltammetry of nitrobenzene with cysteine and other acids in DMSO. Implications for the biological reactivity of reduced nitroaromatics with thiols. **Electrochimica Acta**, n. 92, p. 257-268, 2013.

ARGUELHO, M. L. P. M., SILVA, G. M.; STRADIOTTO, N. R. Electroreduction of benznidazole in dimethylsulphoxide. **Journal of the Electrochemical Society**, n. 148, p. D1-D3, 2001.

BADGUDJAR, D. M. et al Environmentally benign synthesis of aromatic nitro compounds using sílica supported inorganic nitrates. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v 66, p. 250-251, March 2007.

BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R. **Electrochemical Methods”Fundamentals and Applications**. 2nd ed. New York. JOHAN WILEY & SONS, INC. . 1944.

BARETY, et al Electrochemical behaviour of nitroimidazole derivatives in dimethylsulfoxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 162, p. 335-341, 1984.

BENDESKY, Andrés; MENÉNDEZ, Daniel; OSTROSKY-WEGMAN, Patricia. Is metronidazole carcinogenic? **Mutation Research**, n. 511, p. 133–144, 2002.

BENIGNI, Romualdo; BOSSA, Cecilia. Mechanisms of Chemical Carcinogenicity and Mutagenicity: A Review with Implications for Predictive Toxicology. **Chemical Reviews** n. 111, p. 2507–2536, 2011.

BÉRUBÉ, Luc R. et al Effect of 1-methyl-2-nitrosoimidazole on intracellular thiols and calcium levels in Chinese-Hamster ovary cells. **Biochemical Pharmacology**, v 42, n. 11 p. 2153-2161, 1991.

BOLLO, S. et al Voltammetric reduction of 4-nitroimidazole derivatives: Influence of the N-1 substitution in protic and aprotic media. **Electrochimica Acta**, n. 55, p. 4558–4566, 2010.

BORMAN, S. A. New electroanalytical pulse techniques. **Analytical Chemistry**, n. 54, p. 698A, 1982.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, v. 5, p. 236-244. 416-418, 1996.

BRETT, A.M. Oliveira et al Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, n. 332, p. 321–329, 2004.

BRETT, Ana Maria Oliveira et al Comparison of the Voltammetric Behavior of Metronidazole at a DNA-Modified Glassy Carbon Electrode, a Mercury Thin Film Electrode and a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 9, n. 2, p. 110-114, 1997.

BRETT, Christopher M.A.; BRETT, Ana Maria C.F. Oliveira; **ELECTROCHEMISTRY: Principles, Methods, and Applications**. Oxford New York Tokyo. OXFORD UNIVERSITY PRESS. 1993.

BRUNTON, Lourence L.; LAZO, Jhon S.; PARKER, Keith L. **As bases farmacológicas da Terapêutica**. 11^a ed. Goodman & Gilman. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 2006.

BUREŠOVÁ, R. **Electrochemical analysis of nucleic acids and adducts of DNA with anticancer drug mitomycin C (in Czech)**. PhD Thesis. Masaryk University, Brno. 1997.

BURET, AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. **Parasite**. N. 15, p. 261–265, 2008.

BUSATTI, Haendel G.N.O. et al. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. **Parasitology Research**, n. 102, p. 145–149, 2007.

BUSATTI, Haendel G.N.O. et al Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 75, p. 160–164, 2013.

BUSCHIMI, A. et al Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. **Journal of Parasitology** n. 10, p. 1155, 2009

CABRAL, M. F., et al Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, n. 2, 2003.

CARBAJO, J. et al Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 531, p. 187-194, 2002.

CARVALHO, Luiz Pedro s. et al Nitazoxanide Disrupts Membrane Potential and Intrabacterial pH Homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, n. 2 (11), p. 849–854, 2011.

CAVALCANTI, Janesmar.C.M. Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-*Helicobacter pylori* metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. **Bioelectrochemistry**, n. 63, p. 353–357, 2004.

CAVALCANTI, Janesmar C. M. et al Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti-*Helicobacter pylori* metronidazole isostere. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 571, p. 177-182, 2004.

CHEN, Shen-Ming; CHEN, Sz-Vin. The interaction of water-soluble iron porphyrins with DNA films and the electrocatalytic properties for inorganic and organic nitro compounds. **Electrochimica Acta**, n. 48, p. 4049-4060, 2003.

De ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation electrochemical and bioactive properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 19-35, 2002.

De ABREU, Fabiane C. et al The Application of DNA-Biosensors and Differential Scanning Calorimetry to the Study of the DNA-Binding Agent Berenil. **Sensors**, n. 8, p. 1519-1538, 2008.

De OLIVEIRA, Vanessa Kelly Silva; COSTA, Lorena; Da FONSECA, Cristiane Alves. Principais Aplicações Da Biotecnologia Na Medicina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3 n. 2, p. 42-43, 2006.

De PAIVA, Yen G. et al Correlation between Electrochemical and Theoretical Studies on the Leishmanicidal Activity of Twelve Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 23, n. 5, p. 894-904, 2012.

De SOUZA, Antonio Albuquerque. **ESTUDOS BIOELETROQUÍMICOS DE NITROQUINONAS DERIVADAS DA NOR- β -LAPACHONA**. Tese (Doutorado em Química) – UFAL, Maceió, 2011.

DEHGHAN, Gholamreza; ARVIN, Mitra; HOSEINPOURFEIZI Mohammadali. Spectroscopic and electrochemical studies of interaction between Azorubine and CT-DNA. International Conference on Medical, **Biological and Pharmaceutical Sciences** (ICMBPS'2011) Pattaya Dec. 2011

DICULESCU, Victor Constantin; PAQUIM, Ana-Maria Chiorcea; BRETT, Ana Maria Oliveira. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. **Sensors**, n. 5, p. 377-393, 2005.

DOBIÁŠ, Lubomír; ČERNÁ Milena, Cerna; RÖSSNER, Pavel; ŠRÁM, Radim. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. **Mutation Research**, n. 317, p. 177-194, 1994.

DUNN LA, et al A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* in vitro. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 36, p. 37– 42, 2010

EDWARDS DI. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 31, p. 9–20, 1993.

EHLHARDT, William J., BIAULIU, Bernard B.; GOLDMAN Peter. Nitrosoimidazoles – highly bactericidal analogs of 5-nitroimidazole drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 31, p. 323, 1998.

ESPOSITO, Marco et al In Vitro Efficacies of Nitazoxanide and Other Thiazolides against *Neospora caninum* Tachyzoites Reveal Antiparasitic Activity Independent of the Nitro Group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 3715–3723, Sept. 2005.

EYER, Peter. Reactions of oxidatively activated arylamines with thiols – reaction mechanisms and biologic implications – an overview, **Environmental Health Perspectives**, n. 102, p. 123, 1994.

EYER, Piter; LIERHEIMER E.; SCHNELLER, M. Reactions of nitrosochloramphenicol in blood. **Biochemical Pharmacology**, vol. 33, n. 14, p. 2299–2308, 1984.

GARDNER, T.; HILL, D. Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 114-128, 2001.

GASTER, Richard S. et al Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine. **Nature Medicine**, v 15, n. 11, Nov. 2009.

GERDING, D.N. Metronidazole. In: P.K Peterson and J. Verhoef (Eds.), **Antimicrobial Agents Annual 2, Elsevier**, New York, p. 131-136.

GÓMEZ-ARROYO, Samdra; et al Cytogenetic study of metronidazole and three metronidazole analogues in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation. **Toxicology in Vitro**, n. 18, p. 319–324, 2004.

GOULART, Marília. O. F. et al Application of electrochemistry in biomedical sciences: electrochemistry of antiparasitic drugs. **Kelara: Transworld Research Network**, p.1-32, 2006.

GOULART, Marília O. F. et al Electrochemical Study of Methyl 2-[p-Nitrophenyl(Hydroxy)-Methyl] Acrylate, an Anticancer Drug, in the Presence of GSH and dsDNA. **Journal of the Electrochemical Society**, n. 154 (11), p. 121-129, 2007.

HAGER, W.D.; RAPP, R.P. Metronidazole. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, n. 19, p. 497-510, 1992.

HALL, Belinda S.; WILKINSON, Shane R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56 (1), p. 115-23, Jan. 2012.

HANYSZ, Grazielle Balani, GALLHARDI, Lígia Carla F. **Helicobacter pylori: Etiologia, Diagnóstico e Tratamento**. Faculdade Integrada INESUL – Instituto de Ensino Superior de Londrina.

HRDÝ, Ivan et al Alternative Pathway of Metronidazole Activation in Trichomonas vaginalis Hydrogenosomes. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v.49, n12, p. 5033–5036, Dec. 2005.

INFORMAÇÃO CORPORATIVA: **Acerca da Elsevier | Aviso Legal | Elsevier España**. Disponível em <<http://www.elsevier.pt/pt/revistas/revista-portuguesa-saude-publica-323>>. Acesso em 25 ago. 2014.

IUNI-IUI, Zhai; HONG, Cui; RUIFU, Yang. Dna based Biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 15. n. 1, p. 43-58, 1997.

JANJUA, Naveed Kausar et al Cyclic Voltammetric Investigation of Interactions between Bisnitroaromatic Compounds and dsDNA. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 58, n. 2, 2014.

JENKS, Peter J.; EDWARDS; David I. Metronidazole resistance in Helicobacter pylori. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 19, p.1–7, 2002.

JIANG, Xiaohua; LIN, Xiangqin. Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. **Bioelectrochemistry**, n. 68, p. 206– 212, 2006.

JOHNSON P.J. Metronidazole and Drug Resistance. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, 1993.

JORGENSEN, M.A., TREND, M.A., HAZELL, S.L. MENDZ, G.L. **Antimicrobial Chemotherapy**, n. 41 p. 67, 1998
KAAKOUSH, Nadeem O; MENDZ, George L. Helicobacter pylori disulphide reductases: role in metronidazole reduction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 44, p. 137–142, 2005.

KALANUR, Shankara S., KATRAHALLI, Umesha, SEETHARAMAPPA, Jaldappagari. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 636, p. 93–100, 2009.

KAPOOR, V. K et al Medicinal Significance of Nitroimidazoles. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 62, p. 659-655, July 2003.

KOVACIC, Peter; SOMANATHAN, Ratnasamy. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. Review Article. **Journal of Applied Toxicology**, n. 34, p. 810-824, 2014.

KRÖGER, Silke; LAW, Robin J. Biosensors for marine applications. We all need the sea, but does the sea need biosensors? Review. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 20, p.1903–1913, 2005.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Quimica Nova**, v. 22, p. 7897, 1999.

LEITSCH, David et al Nitroimidazole action in Entamoeba histolytica: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biology**, n. 5, p.1820–34, 2007.

LEITSCH, David et al Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in Giardia lamblia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 66, p. 1756– 1765, 2011.

LEITSCH, David et al Trichomonas vaginalis: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase

and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 2, 518–536, 2009.

LEMÉE V et al Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.46, p.819–219, 2000.

LI, Huan et al The Syntheses and Crystal Structures of Metronidazole-derived Compound. **Journal of Chemical Crystallography**, n. p. 461-466, 2008.

LIVERTOUX, Marie-Helèn; LAGRANGE, Philippe; MINN, Alain. The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential, **Brain Research**, n. 725, p. 207-216, 1996.

LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta Edlund; NORD Carl Erik. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. SUPPLEMENT ARTICLE. **Clinical Infectious Diseases**, n. 50, p.S16–23, 2010. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>, acesso em: 15 ago. 2014.

LORCY, Dominique et al π -Donor layer coverage onto glassy carbon by electrochemical means. Reduction of ω -iodoalkyl-tetrathiafulvalenes. **Electrochimica Acta**, n. 89, p. 784–791, 2013.

MANDAL, P.C. Reactions of the nitro radical anion of metronidazole in aqueous and mixed solvent: a cyclic voltammetric study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 570, p. 55–61, 2004.

MARAN, Flavio; WORKENTIN, Mark S. Dissociative Electron Transfer. The Electrochemical Society Interface, p. 44-49, 2002.

MASCINI M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, n. 13 (7 "8), p.637 "657, 2008.

MORETH, M et al Nitroimidazóis – uma promissora classe de substâncias para o tratamento da Tuberculose. **Revista Virtual de Química**, n. 2 (2), p. 105-117, 2010.

MORITA, Kotaro et al Grafting of phenylboronic acid on a glassy carbon electrode and its application as a reagentless glucose sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 656, p. 192–197, 2011.

MORTELMANS, Kristien; ZEIGER, Errol. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, n. 455 (1–2), p. 29–60 Nov 2000).

MULCAHY R. Timoty et al Cyto-toxicity and glutathione depletion by 1-methyl-2-nitrosoimidazole in human-colon cancer-cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 10, p. p. 1667-1671, 1989.

MUKHERJEE, Arnab et al On the Molecular Mechanism of Drug Intercalation into DNA: A Simulation Study of the Intercalation Pathway, Free Energy, and DNA Structural Changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 30, p. 9747–9755, 2008.

MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, n. 93, p.165–171, 1983.

NAGATTA, Noriyuki; et al Current treatment options for Dientamoeba fragilis infections. Review. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, n. 2, p. 204–215, 2012.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo. Atheneu. 2003.

NÚÑEZ-VERGARA, Luis J. et al Reactivity of the one-electron reduction product from nifedipine with relevant biological targets. **Chemico-Biological Interactions** n. 101, p. 89-101, 1996.

NÚÑEZ-VERGARA, Luis J. et al Scavenging of the one-electron reduction product from nisoldipine with relevant thiols: electrochemical and EPR spectroscopic evidences. **Pharmaceutical Research**, n. 15, p. 1690 11, 1998.

OLIVEIRA, Natália Velásquez, **Estudos Bio-Eletróquímicos de Compostos de Interesse Biológico: Metronidazol e Derivados Nitroimidazólicos**. Dissertação (Mestrado em Química) – UFAL, Maceió, 2004.

PALEČEK, Emil et al Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 13, p. 621–628, 1998.

PALEČEK, Emil; JELEN, F.; TRNKOVA, L. Cyclic voltametry of DNA at a mercury electrode: an anodic peak specific for guanine. **General Physiology Biophysics**, n 5, p. 315–329, 1986.

PAULA, Fávero Reisdorfer, SERRANO, Silva helena Pires e TAVARES, Leoberto Costa. Aspectos Mecanísticos da Bioatividade e Toxicidade de Nitrocompostos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PEDANO, M.L.; RIVAS, G.A. Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 18, p. 269-277, 2003.

PEREZ-REYES, Edward; KALYANARAMAN, B.; MASON, Ronald P. The reductive metabolism of metronidazole and ronidazole by aerobic liver microsomes. **Molecular Pharmacology**, n17, p. 239-244, 1980.

PINDUR, Ulf; JANSEN, Michaela; LEMSTER, Thomas. Advances in DNA-Ligands with Groove Binding, Intercalating and/or Alkylating Activity: Chemistry, DNA-Binding and Biology. **Current Medicinal Chemistry**, n. 12, p. 2805-2847, 2005.

POIZOT, Philippe et al Changes in a glassy carbon surface by the cathodic generation of free alkyl radicals mediated by a silver–palladium catalyst. **Carbon**, n. 50, p. 73–83, 2012.

PRAY Leslie A. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. © 2008 Nature Education. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/discoveryofdnastructureandfunction-watson397>>. Acesso em: 17 Jan. 2015.

PUC-Rio – Certificação Digital Nº 0212140/CA. Determinações do ciclofenil utilizando o fotoproduto eletroativo no eletrodo de mercúrio. Disponível em: <http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/5180/5180_5.PDF> Acesso em: 10 dez. 2014.

PUROHIT, Vandana; BASU Ashis K. Mutagenicity of Nitroaromatic Compounds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 8, 2000.

RADKE, Stephen M.; ALOCILJA, Evangelyn C. A Microfabricated Biosensor for Detecting Foodborne Bioterrorism Agents. **IEEE Sensors Journal**, VOL. 5, NO. 4, AUGUST 2005.

RAUF S. et al Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 37, p. 205–217, 2005.

REDSHAW, Natalie et al A preliminary investigation into the use of biosensors to screen stomach contents for selected poisons and drugs. **Forensic Science International**, n. 172, p. 106–11, 2007.

SANCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N.E.; PAEZ J.A. Chagas disease: progress and new perspectives, **Current Medicinal Chemistry**, n. 17, p. 423, 2010.

SCARPIGNATO, C. Towards the ideal regimen for Helicobacter pylori eradication: the search continues. **Digestive and Liver Disease**, n. 36, p. 243–247, 2004.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE. **MANUAL DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. GIARDIA LAMBLIA/GIARDÍASE**. INFORME -NET DTA. Texto organizado por Danilo de Souza Maltez - aluno de Medicina Veterinária da Faculdade Metodista, estagiário voluntário na Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2002.

SHARMA, Heena et al Biosensors: tool for food borne pathogen detection. **Veterinary World**, EISSN: v. 6, p. 2231-0916, Dec - 20013. Disponível em: <www.veterinaryworld.org>. Acesso em: 16 ago. 2014.

SIMONE, Jacques. Glassy carbon electrodes doped by surface graphite nano-flakes Multi-step redox transitions functionalization. **Electrochemistry Communications**, n. 30, p. 17–20, 2013.

SIMSEK, Z., ZEYREK F.Y.; KURCER M. A. Effect of Giardia infection on growth and psychomotor development of children aged 0–5 years. **Journal of Tropical Pediatrics**, n. 50, p. 90–93, 2004

SINGH, Vijayata et al Biosensor Developments: Application in crime detection. National Conference on Synergetic Trends in engineering and Technology (STET-2014) **International Journal of Engineering and Technical Research ISSN**, p. 2321-0869, 2014.

SIQUEIRA, Jullyana S. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* – Revisão. **RBAC**, v. 39(1), p 9-13, 2007.

SIRAJUDDIN, Muhammad; ALI, Saqib; BADSHAH, Amin. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. Short Revie. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 124, p. 1–19, 2013.

SISSON, Gary. Enzymes Associated with Reductive Activation and Action of Nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2116–2123, July 2002.

SMITH, Michael B; MARCH Jerry. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. c2007.

SOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP, **Instrumental Methods In Electrochemistry**, Woodhead Publishing Limited, 2011.

SOUZA, Djenaine de, MACHADO, Sergio A. S.; AVACA Luis A. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. PRIMEIRA PARTE: ASPECTOS TEÓRICOS. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SQUELLA J.A., BOLLO S., NÚÑEZ-VERGARA L.J. Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance. **Current Organic Chemistry**, n. 9, p. 565-581, 2005.

SQUELLA, J.A. et al Electrochemical reduction of 2-nitroimidazole in aprotic medium: Influence of its dissociation equilibrium on the reduction mechanism. **Electrochimica Acta**, n.52, p. 511–518, 2006.

SUSPIRO, Alexandra; PRISTA, João. Exposição ocupacional a citostáticos e efeitos sobre a saúde. **Publicado na Revevista Portuguesa de Saúde Pública**, n 30, p. 76-88, 2012.

THOMPSON RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal of Parasitology**, n. 30, p. 1259–1267, 2000.

THOMPSON, R.C.A; REYNOLDSON J.A.; MENDIS A.H.W. Giardia and giardiasis. **Advances in Parasitology**, n. 32, p.71-160, 1993.

TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds, **General Pharmacology**, n. 28, p. 485, 1997.

TOCHER, Joanne H.; EDWARDS, David I. Evidence For The Direct Interaction Of Reduced Metronidazole Derivatives With DNA bases. **Biochemical & Pharmacology**, v, 48, n. 6, p. 1089, 1994.

TOCHER, Joanne H.; EDWARDS, David I. The interaction of reduced metronidazole with DNA bases and nucleosides. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 22, n. 4, 1992.

TOMASZ, M., The mitomycins: natural cross-linkers of DNA. In: Neidle, S., Waring, M. J. (Eds.), *Molecular basis of drug-DNA antitumour action*. Macmillan Press, London, v. 2, p. 312–349, 1993.

TOWNSON S.M. et al Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Tropica**, n. 56, p. 173–174, 1994.

TOWNSON, S.M; UPCROFT JA, UPCROFT, P. Characterisation and purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, n. 79, p. 183– 93, 1996.

TSAI, Tung-Hu; CHEN, Yen-Fei. Pharmacokinetics of metronidazole in rat blood, brain and bile studied by microdialysis coupled to microbore liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 987, p. 277–282, 2003.

TUDORACHE Madalina; BALA, Camelia. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, n. 388, p. 565–578, 2007.

UPCROFT J.A, et al Efficacy of new 5-nitromidazoles against metronidazole susceptible and resistant Giardia, Trichomonas and Entamoeba spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, n. 43, p 73–76, 1999.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 14, p. 150–164, 2001

VALDEZ, Carlos A. et al Synthesis and Electrochemistry of 2-Ethenyl and 2-Ethanyl Derivatives of 5-Nitroimidazole and Antimicrobial Activity against Giardia lamblia. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52(13), p. 4038–4053, 2009.

VALENTE, Cristiane Oliveira. **Desenvolvimento de um Biossensor a Base de Hemina para Análise de Amodiaquina em Leite Materno**. Dissertação de Mestrado. São Cristóvão – Sergipe – 2010.

WANG, Joseph et al Adsorption and detection of peptide nucleic acids at carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, n. 9, p. 120–124, 1997b.

WANG, Joseph. **Analytical electrochemistry**, 3rd ed, John Wiley & Sons, USA, 2006.

WANG, Joseph. DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 13, p. 757–762, 1998.

WANG, Joseph. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 21, p. 1887–1892, 2006.

WANG, Zhenxin; LIU, Dianjun; DONG, Shaojun. In situ infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, n. 53, p. 175–181, 2001.

WANNMACHER, Lenita. A erradicação do Helicobacter pylori. **ISSN 1810-0791**, n. v. 4, n. 9, Brasília, agosto de 2007.

WARDMAN, P. Selective Activation of Drugs by Redox Processes. ed. **G. E. Adams**, New York, 1990. P. 11-24.

WENSAAS K.A., LANGLAND N., RORTVEIT G. Post-infectious gastrointestinal symptoms after acute giardiasis. A 1-year follow-up in general practice. **Family Practice**, n. 27, p. 255–259, 2010.

WRIGHT J.M et al Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opinion on Drug Safety**, n. 2, p. 529–541, 2003.

YOLA, Mehmet Lütfi; ÖZALTIN, Nuran. Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 653, p. 56–60, 2011.

ZANELLO, Piero. **Inorganic Electrochemistry Theory, Practice and Application**. The Royal Society of Chemistry 2003. Cambridge, UK. Advancing the chemical sciences.

ANEXOS

Tabela 12 – Grupos abandonadores listados pela ordem aproximada da capacidade de sair.

Substrate RX	Common Leaving Groups	
	At Saturated Carbon	At Carbonyl Carbon
RN ₂ ⁺	x	
ROR' ₂ ⁺		
ROSO ₂ C ₄ F ₉		
ROSO ₂ CF ₃	x	
ROSO ₂ F		
ROTs, etc. ^b	x	
RI	x	
RBr	x	
ROH ₂ ⁺	x (conjugate acid of alcohol)	
RCl	x	x (acyl halides)
RORH ⁺	x (conjugate acid of ether)	
RONO ₂ , etc. ^b		
RSR' ₂ ⁺⁴⁰⁰		
RNR' ₃ ⁺	x	
RF		
ROCOR' ⁴⁰¹	x	x (anhydrides)
RNH ₃ ⁺		
ROAr ⁴⁰²		x (aryl esters)

(continued)

Fonte: Smith, March, 2007

Tabela 13 – Constantes relativas de solvólise de ésteres 1-feniletila e haletos.

Leaving group	k_{rel}
CF ₃ SO ₃ ⁻ (triflate)	1.4 × 10 ⁸
<i>p</i> -Nitrobenzensulfonate (nosylate)	4.4 × 10 ⁵
<i>p</i> -Toluenesulfonate (tosylate)	3.7 × 10 ⁴
CH ₃ SO ₃ ⁻ (mesylate)	3.0 × 10 ⁴
I ⁻	91
Br ⁻	14
CF ₃ CO ₂ ⁻	2.1
Cl ⁻	1.0
F ⁻	9 × 10 ⁻⁶
<i>p</i> -Nitrobenzoate	5.5 × 10 ⁻⁶
CH ₃ CO ₂ ⁻	1.4 × 10 ⁻⁶

a. From D. S. Noyce and J. A. Virgilio, *J. Org. Chem.*, **37**, 2643 (1972).

b. In 80% ethanol at 75 °C.

Fonte: CAREY; SUNDBERG, 2007.