

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química – Araraquara

ANDRÉ LUIZ DOS SANTOS

**Estudo da Redução Eletroquímica e Desenvolvimento
de Métodos Eletroanalíticos para a Determinação
de Dicloroacetamidas com Atividade Antiamebíaca**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara

2007

DEDICATÓRIA

Faço minhas as palavras de Isaac Newton: “Só pude ver mais longe porque estava sobre ombros de gigantes”. Espero conquistar e manter sempre comigo:

A honestidade e retidão de caráter de meu pai João,

A bondade e pureza de coração de minha mãe Dirce,

A simplicidade e sinceridade de minha irmã Joseli,

A força de vontade e perseverança de meu irmão João Filho.

Dedico este trabalho a vocês, cujas presenças sempre iluminaram minha jornada.

A minha namorada Regina, pelo amor, presença constante, por toda paciência e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos:

- A DEUS, pois sem Ele nada é possível.
- Ao Prof. Nelson Ramos Stradiotto pela oportunidade oferecida. Por toda paciência e bom-humor demonstrado no exercício da docência. Por apesar de seus inúmeros compromissos, mostrar-se presente e agir de forma contundente nos momentos decisivos, nos quais mais precisei de sua orientação.
- A(o) assessor(a) da FAPESP, pela leitura atenta de meus relatórios, pelas críticas e sugestões, as quais contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento de meu trabalho. A(o) senhor(a) meus sinceros agradecimentos.
- A Prof^ª. Maria Valnice pelos momentos de discussão e descontração. Pela iniciativa e força de vontade para garantir “a continuidade do show”.
- A Prof^ª. Hideko, pela convivência extremamente agradável tanto nas discussões como nos momentos de descontração. Por todo o empenho para garantir o entrosamento do grupo. Agradeço principalmente por seu caráter e valores humanos, os quais são exemplos e contribuíram muito para minha formação pessoal.
- A Prof^ª. Maria José Medeiros, por me acolher de forma tão amável na Universidade do Minho. Pelos ensinamentos, discussões e também pelos momentos de convívio diário. O empenho e a dedicação da professora fizeram com que me sentisse em casa, mesmo estando distante.
- A Prof^ª. Ana Paula Esteves por toda ajuda durante o desenvolvimento de meu estágio na Universidade do Minho. Pela inestimável ajuda na interpretação dos espectros de H-RMN e pela paciência para tentar me ensinar um pouco sobre a técnica.
- Ao Prof. Pier Parpot e a Prof^ª. Isabel, pelos agradáveis jantares e pelas discussões sobre os mais variados temas.
- A Prof^ª. Pierina Sueli Bonato pelas dicas sobre os caminhos a percorrer para a aquisição dos fármacos junto às indústrias farmacêuticas.
- Ao Prof. Paulo Olivi, meu primeiro orientador, cuja ética e seriedade tento levar comigo até os dias de hoje.

- Ao Professor Julien F. C. Boodts, cuja competência, amor pela ciência e pela docência são incentivos e inspiração para todos os alunos que tem o privilégio de conviver com o senhor.
- A todos os bons professores que encontrei em minha jornada acadêmica, cujos nomes não caberiam aqui. Vocês não transmitiram apenas conhecimentos técnicos, mas deixaram também um pedaço de vocês mesmos. Levarei isso sempre comigo quer seja em minha vida profissional quer seja na pessoal.
- A todos os maus professores que encontrei em minha jornada acadêmica, cujos nomes também não caberiam aqui. Vocês me ensinaram claramente o que NÃO se deve fazer, o que, muitas vezes, é tão importante quanto saber o que se deve fazer.
- Ao amigo Márcio, pela amizade que espero conservar para toda a vida. Pelas discussões sobre química, jogos eletrônicos, política, filosofia, etc.. Também pelas besteiras e piadas que aliviaram o estresse diário. Por sua competência aliada à humildade e bom humor, características típicas de pessoas realmente muito inteligentes. Cara! Eu aprendi muito com você, o “mano Márcio”. Valeu mano...
- Ao casal Daniela (a Dani) e Jefferson, pelo prazer da companhia não só no ambiente de trabalho como também em nossos jantares, os quais propiciaram momentos muito felizes e, segundo a Dani, uns quilinhos adicionais.
- Ao amigo Magno pelo convívio agradável, pelas discussões e por demonstrar na prática o ditado popular: “Nunca deixe para amanhã o que pode ser feito hoje”.
- Aos amigos “mais antigos” do grupo de eletroanalítica: Antônio, Carolina, Diana, Fabiana, Leandro, Leonardo, Marly, Michelle, Paula, Paulo Brasil, Ricardo por proporcionarem um convívio muito agradável.
- Aos amigos da nova geração do grupo de eletroanalítica, cujos nomes não me atrevo a colocar aqui, pois certamente cometerei alguma injustiça e esquecerei alguém, afinal este grupo não pára de crescer.
- As amigas da Universidade do Minho: Cristina, Ana Soares e Milene. Apesar do pouco tempo de convívio, vocês se mostraram pessoas fantásticas e que me marcaram para sempre. “Há pessoas incríveis, não há?”

- Aos amigos da Universidade do Minho com os quais tive ainda menos contato, mas que nem por isso se mostraram menos fantásticos ou importantes: Ana Rodrigues, Marília, Eliza, Jorge, João (cafajeste), Rui e Hugo.
- Ao Sr. José Carlos Lopes de Oliveira (tio Zé), pelas agradáveis pescarias e também por aquelas verdadeiras “robadas” que nos metemos (pesqueiro cana brava, açude do boi bravo... cada uma hein!). Pelas conversas e ensinamentos que certamente contribuirão para me tornar uma pessoa melhor.
- Ao seu Roberto, pelas agradáveis conversas, embora raras nesta reta final. Por todo o incentivo, apoio, por me ensinar, com sua sabedoria única, a importância da serenidade e da paciência. E como não podia deixar de ser, muito obrigado pela companhia durante nossas pescarias.
- A dona Maria, pelos agradáveis momentos de descontração, por toda a preocupação com minha vida acadêmica e, claro, pelas agradáveis pescarias.
- Aos responsáveis por adotarmos estas normas para a citação de referências, vocês me ensinaram uma importante lição: Existe sempre uma maneira complicada para fazer as coisas, por mais simples que elas sejam... O mês que o artigo foi publicado! A cidade da revista! Ora, sem comentários!
- Ao IQ-UNESP-Araraquara e a todos os seus funcionários por proporcionarem um ambiente de trabalho muito adequado.
- A FAPESP (proc. 03/05567-7) pela bolsa concedida.
- A CAPES pela concessão da bolsa inicial e PDEE (proc. BEX 1088068), a qual permitiu o desenvolvimento de meu estágio na Universidade do Minho – Braga – Portugal.
- A Pfizer do Brasil e Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. por gentilmente cederem os padrões da etofamida (Pfizer) e do teclozan (Sanofi-Aventis).
- A todos que direta ou indiretamente tenham contribuído para o desenvolvimento deste trabalho.

Epígrafe

“Nunca conseguiremos alcançar a felicidade se não contribuirmos para a felicidade dos outros. Uma vida centrada em si mesmo é egoísta, vazia e incapaz de produzir qualquer tipo de felicidade”. (D. José Policarpo – Arcebispo de Lisboa)

“Ninguém é tão burro a ponto de não ter nada para ensinar e ninguém é tão inteligente a ponto de não ter nada para aprender”. (Márcio F. Bergamini)

“Devemos lembrar que, apesar de todas as pressões, pesquisa que fazemos já sabendo o resultado não é pesquisa”. (Prof. Dr. Eduardo F. A. Neves)

Resumo

Neste trabalho estudou-se, sobre carbono vítreo, a redução eletroquímica do furoato de diloxanida (FD), do teclozan (TEC) e da etofamida (ET), os quais são os principais representantes dos fármacos amebicidas da classe das dicloroacetamidas. Em virtude da insolubilidade destes compostos em soluções aquosas, os estudos eletroquímicos foram realizados em acetonitrila contendo diferentes sais quaternários de amônio como eletrólito de suporte. Estes estudos foram realizados tanto para fins de elucidação dos processos eletródicos quanto para o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a quantificação destes fármacos em formulações farmacêuticas. A redução eletroquímica das dicloroacetamidas foi estudada pela técnica de voltametria cíclica e por eletrólises a potencial controlado, sendo os produtos eletrogerados isolados por meio de extração líquido-líquido e submetidos a análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e por cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos mostraram que a redução eletroquímica de todas as dicloroacetamidas estudadas envolve a quebra redutiva de suas ligações C-Cl, sendo verificado que as eletrólises originaram uma complexa mistura de produtos. Este comportamento pode ser atribuído a várias reações químicas acopladas envolvendo intermediários eletrogerados. Verificou-se que a redução do FD e do TEC envolve a transferência de 4 elétrons, enquanto a redução eletroquímica da ET envolve 5 elétrons. Foi observado que a redução eletroquímica do TEC na presença de um doador de prótons conduz a sua completa descloração em etapas sucessivas. A primeira etapa reduz seus grupos CHCl_2 a CH_2Cl enquanto a segunda reduz os grupos CH_2Cl a CH_3 . A redução eletroquímica da ET na ausência de um doador de prótons envolve dois processos eletródicos, o primeiro associado à redução de seu grupo nitro ao respectivo ânion-radical ($\text{R-NO}_2^{\bullet-}$) e o segundo associado à quebra de suas ligações C-Cl. Na presença de um doador de prótons, verificou-se que o grupo nitro da ET é reduzido a hidroxilamina em uma única etapa envolvendo quatro elétrons. Os estudos visando o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a quantificação das dicloroacetamidas foram realizados empregando-se as técnicas de voltametria de varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada. Para o TEC, foi desenvolvido também um método eletroanalítico baseado em sua detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas. Verificou-se que todas as metodologias desenvolvidas se mostraram apropriadas para a quantificação das dicloroacetamidas estudadas. Os métodos desenvolvidos foram empregados com êxito para a determinação do TEC e da ET em amostras comerciais de formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos nestes estudos mostraram que os excipientes presentes nas amostras comerciais não interferem na determinação destes fármacos pelos métodos eletroanalíticos desenvolvidos, dispensando etapas de pré-tratamento das amostras. Desta forma, os métodos eletroanalíticos desenvolvidos permitiram a determinação do TEC e da ET em formulações farmacêuticas de maneira rápida, simples e com um custo instrumental relativamente baixo.

Palavras chave: Eletroanalítica, Dicloroacetamidas, Amebíase, Redução Eletroquímica.

Abstract

In this work, the electrochemical reduction of diloxanide furoate (DF), teclozan (TEC) and etofamide (ET) was studied on glassy carbon. These compounds are the most important dichloroacetamide derivatives employed in amoebiasis treatment. Due to the poor solubility of these drugs in aqueous solutions, the electrochemical studies were performed in acetonitrile containing different ammonium quaternary salts as supporting electrolyte. The electrochemical studies were performed aiming to elucidate the electrode processes and to develop electroanalytical methods for dichloroacetamides quantification in pharmaceutical formulations. The electrochemical reduction of the dichloroacetamides was studied by cyclic voltammetry and controlled-potential electrolyses. The electrogenerated products were isolated by liquid-liquid extraction and submitted to analyses by hydrogen nuclear magnetic resonance spectrometry and thin layer chromatography. It was observed that the electrochemical reduction of all studied dichloroacetamides involves the cleavage of their C-Cl bonds. In absence of a proton donor, all electrolyses have produced a very complex mixture as a consequence of several coupled chemical reactions involving electrogenerated intermediates. It was observed that DF and TEC reduction involves 4 electrons and ET reduction involves 5 electrons. The electrochemical reduction of TEC in presence of a proton donor leads to its complete dechlorination in successive steps. The first step promotes mainly the reduction of the groups CHCl_2 to CH_2Cl and the second one promotes the reduction of the groups CH_2Cl to CH_3 . The ET electrochemical reduction in absence of a proton donor involves two electrode processes; the first reduces its nitro group to the respective radical-anion ($\text{R-NO}_2^{\bullet-}$) and the second one is associated to the reductive cleavage of C-Cl bonds on ET molecule. In presence of a proton donor, the nitro group of ET is reduced to hydroxylamine in a single step involving 4 electrons. The electroanalytical methods were developed by using linear sweep, differential pulse and square wave voltammetry. In addition, an amperometric method in hydrodynamic conditions was developed for TEC determination. All developed electroanalytical methods were appropriated for dichloroacetamides quantification. These methods were successfully employed for TEC and ET determination in pharmaceutical formulation samples. The obtained results have shown that these samples have not presented matrix effects. Thus, it was not necessary to use sample pretreatment procedures. As a consequence, the developed electroanalytical methods could be employed for TEC and ET determination in pharmaceutical formulations in a fast, simple and non-expensive way.

Keywords: Electroanalytical, Dichloroacetamides, Amoebiasis, Electrochemical Reduction.

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Entamoeba histolytica</i> . Adaptado da referência [5].	24
Figura 2 - Estruturas moleculares dos principais fármacos da classe das dicloroacetamidas.	26
Figura 3 - Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nas eletrólises preparativas.	52
Figura 4 - Estrutura molecular dos excipientes das formulações farmacêuticas contendo as dicloroacetamidas como princípios ativos.	55
Figura 5 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ a 100 mV s ⁻¹ . (---) Ausência de FD. (—) Presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de FD. Inserido: ampliação da região entre -1,4 e -2,3 V vs. Ag/AgCl _{sat} .	58
Figura 6 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de FD em diferentes velocidades de varredura. (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s ⁻¹ . Inserido: gráfico i_p vs. $v^{1/2}$.	59
Figura 7 - Voltamograma de onda quadrada registrado em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 0,2 mmol L ⁻¹ de FD. Condições voltamétricas: amplitude de pulso = 100 mV, frequência = 400 Hz, incremento de potencial = 5,0 mV.	62
Figura 8 - Variação da razão $I_{direta}/I_{reversa}$ em função da frequência obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada registrados em presença de 0,75 mmol L ⁻¹ de FD em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ .	63
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ a 100 mV s ⁻¹ em presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de FD. (---) Ciclos sucessivos. (—) Ciclo registrado após 30 s com fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica.	64
Figura 10 - Curvas amperométricas obtidas para as eletrólises de 2,0 mmol L ⁻¹ de FD em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . E = -2,3 V vs. Ag/AgCl _{sat} . V _{eletrolisado} = 15 mL. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.	65
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , v = 100 mV s ⁻¹ . (---) Antes da eletrólise; C _{FD} = 2,0 mmol L ⁻¹ . (—) Após a eletrólise.	66
Figura 12 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de diferentes concentrações de TBACl. v = 100 mV s ⁻¹ . (—) 0,5 mmol L ⁻¹ ; (—) 1,0 mmol L ⁻¹ ; (—) 1,5 mmol L ⁻¹ .	67
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/ TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , v = 100 mV s ⁻¹ . (—) Antes da eletrólise; C _{FD} = 2,0 mmol L ⁻¹ . (—) Após a eletrólise. (—) Após a eletrólise com a adição de 0,25 mmol L ⁻¹ de TBACl.	68

Figura 14 - Espectro de H-RMN do FD em CDCl_3 , 300 MHz. Massa de FD igual a 10 mg.....	69
Figura 15 - Estrutura molecular do FD, explicitando alguns de seus átomos de hidrogênio.....	70
Figura 16 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD a 100 mV s^{-1} . (—) ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (---)ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	71
Figura 17 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica obtido após eletrólise do FD em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. 300 MHz, CDCl_3	73
Figura 18 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase aquosa obtido após eletrólise do FD. 300 MHz em CDCl_3	75
Figura 19 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de FD. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 0,75; (—) 2,5; (—) 5,0; (—) 7,5; (—) $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD. Curva analítica inserida.....	82
Figura 20 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE . $t_p = 50 \text{ ms}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	84
Figura 21 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de t_p . $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$..	85
Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD. $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$	86
Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de FD. $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,5; (—) 1,0; (—) 1,5; (—) 2,0; (—) $2,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD. Curva analítica inserida.....	86
Figura 24 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de f . $\Delta E = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 1,0 \text{ mV}$, $C_{\text{FD}} = 0,75 \text{ mmol L}^{-1}$..	87
Figura 25 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE . $f = 400\text{Hz}$, $\Delta E_s = 1,0 \text{ mV}$, $C_{\text{FD}} = 0,75 \text{ mmol L}^{-1}$..	88
Figura 26 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE_s . $f = 400\text{Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $C_{\text{FD}} = 0,75 \text{ mmol L}^{-1}$..	88
Figura 27 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de FD. $f = 400 \text{ Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$. (—) 0,0; (—) 0,025; (—) 0,05; (—) 0,1; (—) 0,25; (—) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD. Curva analítica inserida.	89
Figura 28 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} . (---) Ausência de TEC. (—) Presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC. Inserido: ampliação da região entre $-1,5$ e $-2,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$	93

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC em diferentes velocidades de varredura. (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s ⁻¹ . Inserido: gráfico i_p vs. $v^{1/2}$	94
Figura 30 - Gráfico de E_p vs. $\ln v$ obtido para a redução eletroquímica de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	95
Figura 31 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ a 100 mV s ⁻¹ em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC. (---) Ciclos sucessivos. (—) Ciclo registrado após 30 s com fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica.	96
Figura 32 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de 2,0 mmol L ⁻¹ de TEC em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . $E = -2,4$ V vs. Ag/AgCl _{sat} . $V_{\text{eletrolisado}} = 15$ mL. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.	97
Figura 33 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100$ mV s ⁻¹ . (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{TEC}} = 2,0$ mmol L ⁻¹ . (—) Após a eletrólise. Inserido: ampliação da região entre $-1,2$ e $-2,6$ V vs. Ag/AgCl _{sat}	98
Figura 34 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de 2,0 mmol L ⁻¹ de TEC em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . $E = -1,8$ V vs. Ag/AgCl _{sat} . $V_{\text{eletrolisado}} = 15$ mL. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.	99
Figura 35 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100$ mV s ⁻¹ . (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{TEC}} = 2,0$ mmol L ⁻¹ . (—) Após a eletrólise.	100
Figura 36 - Espectro de H-RMN do TEC em CDCl ₃ . 300 MHz. Massa de TEC igual a 10 mg.	101
Figura 37 - Representação dos dois isômeros de uma acetamida N-substituída originados pela rotação da ligação N-CO [69].	101
Figura 38 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC a 100 mV s ⁻¹ . (---) ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . (—) ACN/TEABr 0,1 mol L ⁻¹	102
Figura 39 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de TEC eletrolisada em ACN/TEABr 0,1 mol L ⁻¹ . 300 MHz, CDCl ₃	104
Figura 40 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC em meio de ACN/TEABr 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100$ mV s ⁻¹ . (—) Presença de 10 mmol L ⁻¹ de HFP. (---) Ausência do doador de prótons.	105

- Figura 41 - Curvas amperométricas relativas às eletrólises realizadas em meio de ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹. E = -2,3 V vs. Ag/AgCl_{sat}. V_{eletrólise} = 25 mL. (---) Presença de 0,1 mol L⁻¹ de HFP e ausência de TEC (—) Presença de 2,4 mmol L⁻¹ de TEC + 0,1 mol L⁻¹ de HFP. Eletrodo de trabalho: disco de carbono vítreo com 2,5 cm de diâmetro.....106
- Figura 42 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica proveniente da eletrólise de 2,4 mmol L⁻¹ de TEC em presença de doador de prótons. 300 MHz, CDCl₃.....107
- Figura 43 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹, v = 100 mV s⁻¹. (---) Antes da eletrólise; C_{TEC} = 2,4 mmol L⁻¹. (—) Após a eletrólise.110
- Figura 44 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica proveniente da eletrólise de 2,4 mmol L⁻¹ de TEC em presença de doador de prótons a -1,8 V vs. Ag/AgCl_{sat}. 300 MHz, CDCl₃.110
- Figura 45 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. v = 100 mV s⁻¹. (—) 0,0; (—) 0,3; (—) 0,6; (—) 1,0; (—) 1,5; (—) 2,0; (—) 3,0 mmol L⁻¹ de TEC. Curva analítica inserida.116
- Figura 46 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. (—) 0,0; (—) 0,25; (—) 0,50; (—) 0,75; (—) 1,0; (—) 1,25; (—) 1,5 mmol L⁻¹ de TEC. Condições voltamétricas: ΔE = 100 mV, t_p = 5,0 ms, v = 20 mV s⁻¹. Curva analítica inserida.....116
- Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. (—) 0,0; (—) 0,25; (—) 0,50; (—) 0,75; (—) 1,0; (—) 1,25; (—) 1,5 mmol L⁻¹ de TEC. Condições voltamétricas: ΔE = 75 mV, f = 100 Hz, ΔE_s = 5,0 mV. Curva analítica inserida.....117
- Figura 48 - Voltamogramas de varredura linear registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) ausência de TEC em condições estáticas, v = 100 mV s⁻¹; (—) presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC em condições estáticas, v = 100 mV s⁻¹; (—) presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC em condições hidrodinâmicas, ω = 500 rpm e v = 2,0 mV s⁻¹.....119
- Figura 49 - Voltamogramas de varredura linear registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC em diferentes valores de ω; v = 2,0 mV s⁻¹.120
- Figura 50 - Gráfico de Levich obtido a partir dos voltamogramas apresentados na Figura 49.....121

- Figura 51 - Amperograma registrado em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹; E = -2,3 V vs. Ag/AgCl_{sat}, ω = 2000 rpm. (A) 2,5 x 10⁻⁵; (B) 7,5 x 10⁻⁵, (C) 1,7 x 10⁻⁴, (D) 3,6 x 10⁻⁴, (E) 5,4 x 10⁻⁴; (C) 7,2 x 10⁻⁴, (D) 8,9 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de TEC.122
- Figura 52 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 50 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Curva de adição de padrão inserida.....124
- Figura 53 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 25 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições voltamétricas: ΔE = 100 mV, t_p = 5,0 ms, v = 20 mV s⁻¹. Curva de adição de padrão inserida.....124
- Figura 54 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 25 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições voltamétricas: ΔE = 75 mV, f = 100 Hz, ΔE_s = 5,0 mV. Curva de adição de padrão inserida.125
- Figura 55 - Amperograma registrado em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ mostrando a resposta amperométrica da amostra comercial e das sucessivas adições de 100 μL de um padrão de TEC 20 mmol L⁻¹ a 20 mL de solução. E = -2,3 V vs. Ag/AgCl_{sat}, ω = 200 rpm. Curva de adição de padrão inserida.125
- Figura 56 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (---) Ausência de ET. (—) Presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET.....129
- Figura 57 - Voltamogramas cíclicos registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET. (—) Sem interrupção da varredura. (—) Interrupção por 5 s. (—) Interrupção por 20 s.....130
- Figura 58 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET em diferentes valores de v. (—) 20; (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 500 mV s⁻¹. Inserido: gráfico i_p vs. v^{1/2}.131
- Figura 59 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET. (—) Primeiro ciclo. (—) Segundo ciclo. (—) Terceiro ciclo. ...133
- Figura 60 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 1,0 (—) 5,0; (—) 10 mmol L⁻¹ de HAc.134

Figura 61 - Variação de i_p em função da concentração de HAc.....	135
Figura 62 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de ET, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Ausência de HAc. (—) Presença de 0,1 mol L ⁻¹ de HAc. .	136
Figura 63 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ a 100 mV s ⁻¹ . (---) Ausência de ET. (—) Presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ET.....	137
Figura 64 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ET, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Ausência de HAc. (—) Presença de 0,1 mol L ⁻¹ de HAc. .	139
Figura 65 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de 2,0 mmol L ⁻¹ de ET em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . $E = -2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.	140
Figura 66 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.	141
Figura 67 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.	141
Figura 68 - Curvas amperométricas relativas às eletrólises de 2,0 mmol L ⁻¹ de ET em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ contendo 0,1 mol L ⁻¹ de HAc. $E = -1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.....	142
Figura 69 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ em presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de ET contendo 0,1 mol L ⁻¹ de HAc, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise. (—) Após a eletrólise.	143
Figura 70 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ contendo 0,1 mol L ⁻¹ de HAc, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Antes e (—) após a eletrólise em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. .	144
Figura 71 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹ contendo 0,1 mol L ⁻¹ de HAc, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise em $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. (—) Após a eletrólise em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$	144
Figura 72 - Espectro de H-RMN da ET em CDCl ₃ . 300 MHz. Massa de ET igual a 10 mg.	146
Figura 73 - Estrutura molecular da ET explicitando seus hidrogênios aromáticos.	147
Figura 74 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr 0,1 mol L ⁻¹ . 300 MHz em CDCl ₃	148

- Figura 75 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.149
- Figura 76 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se $-1,1 \text{ V}$. 300 MHz em CDCl_3150
- Figura 77 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando-se $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ em presença de doador de prótons. 300 MHz em CDCl_3152
- Figura 78 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando-se consecutivamente $-1,1 \text{ V}$ e $-2,1 \text{ V}$ em presença de doador de prótons. 300 MHz em CDCl_3153
- Figura 79 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de ET. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 1,0; (—) 2,0; (—) 3,0; (—) 5,0; (—) 7,5; (—) 10,0 mmol L^{-1} de ET. Curva analítica inserida.156
- Figura 80 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de ET. (—) 0,0; (—) 0,01; (—) 0,03; (—) 0,05; (—) 0,75; (—) 0,10; (—) 0,25 mmol L^{-1} de ET. $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $t_p = 50 \text{ ms}$, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Curva analítica inserida.157
- Figura 81 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de ET. (—) 0,0; (—) 0,05; (—) 0,075; (—) 0,1; (—) 0,25; (—) 0,5; (—) 7,5; (—) 1,0 mmol L^{-1} de ET. $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $f = 300 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$. Curva analítica inserida.157
- Figura 82 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} . (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de $50 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de ET $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 10 mL de solução. Curva de adição de padrão inserida.159
- Figura 83 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de ET 10 mmol L^{-1} a 10 mL de solução. Condições: $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $t_p = 50 \text{ ms}$, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Curva de adição de padrão inserida.160
- Figura 84 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de ET $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a 10 mL de solução. Condições: $f = 200 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$. Curva de adição de padrão inserida.160

- Figura 85 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes valores de pH*. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{ET}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) pH* = 1,0; (—) pH* = 4,0; (—) pH* = 8,0; (—) pH* = 10,0; (—) pH* = 12,0.163
- Figura 86 - Influência do pH* sobre os valores de i_p e E_p relativos à redução da ET em meio misto. 164
- Figura 87 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes valores de ν . pH* = 4,0; $C_{\text{ET}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) 10; (—) 25; (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s^{-1} . Inserido: gráfico de i_p vs. $\nu^{1/2}$ 166
- Figura 88 - Gráficos de i_p vs. $\nu^{1/2}$ obtidos a partir de voltamogramas cíclicos registrados em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ET na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes pH*167
- Figura 89 - Voltamograma de onda quadrada registrado na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* = 9,0 contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET. Condições voltamétricas: $f = 300 \text{ Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$ 168
- Figura 90 - Variação da razão $I_{\text{reversa}}/I_{\text{direta}}$ em função da frequência para diferentes pH*169
- Figura 91 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0 contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Ciclos sucessivos. (—) Registrado após 30 s com fluxo de N_2 na célula eletroquímica.169
- Figura 92 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0 contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Intervalo: 0,0 a +1,0 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. (—) Intervalo: 0,0 a -1,0 V com potencial de inversão anódico igual a +1,0 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$170
- Figura 93 - Curvas amperométricas obtidas para as eletrólises de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0. $E = -0,65 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com $2 \times 2 \text{ cm}$171
- Figura 94 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.172

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Mecanismo proposto para a quebra redutiva da ligação C-X de um alcano monohalogenado [30].	31
Esquema 2 - Reações químicas envolvendo o radical ou o carbânion eletrogerado na quebra redutiva de uma ligação C-X [30].	32
Esquema 3 - Quebra redutiva de uma ligação C-X segundo um mecanismo no qual a transferência eletrônica e quebra de ligação ocorrem conjuntamente.	33
Esquema 4 - Seqüência reacional para a redução eletroquímica de diferentes brometos de acilhidrazonas [40].	34
Esquema 5 - Mecanismo para a primeira etapa da redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].	35
Esquema 6 - Estabilização do carbânion eletrogerado pela redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].	35
Esquema 7 - Seqüência reacional para a segunda etapa da redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].	36
Esquema 8 - Seqüência reacional para a redução eletroquímica da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona [42].	37
Esquema 9 - Seqüência reacional para a redução eletroquímica de haloacetamidas [45].	40
Esquema 10 - Etapas reacionais envolvidas na redução eletroquímica do nitrobenzeno.	44
Esquema 11 - Reação global da oxidação da hidroxilamina ao grupo nitroso.	44
Esquema 12 - Fluxograma representando o procedimento adotado na extração líquido-líquido.	53
Esquema 13 - Possíveis etapas reacionais da redução eletroquímica de ésteres [59].	78
Esquema 14 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do FD.	81
Esquema 15 - Reação global para a redução eletroquímica do FD.	82
Esquema 16 - Seqüência reacional global para a redução eletroquímica do TEC na presença de um doador de prótons.	114
Esquema 17 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do TEC.	115
Esquema 18 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl da ET.	155

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica de 2,0 mmol L ⁻¹ de FD em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	60
Tabela 2 - Interpretação do espectro de H-RMN apresentado na Figura 18 e respectivas estruturas químicas propostas.	76
Tabela 3 - Parâmetros analíticos para a determinação de FD utilizando LSV, DPV e SWV.	90
Tabela 4 - Parâmetros analíticos de diferentes métodos propostos para a quantificação de FD.	91
Tabela 5 - Parâmetros voltamétricos referentes à redução eletroquímica de 1,0 mmol L ⁻¹ de TEC em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	94
Tabela 6 - Atribuição dos sinais do espectro de H-RMN apresentado na Figura 44 e respectivas estruturas químicas propostas.....	111
Tabela 7 - Parâmetros analíticos para a determinação de TEC utilizando LSV, DPV e SWV.....	117
Tabela 8 - Resultados da determinação de TEC na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos.	126
Tabela 9 - Parâmetros voltamétricos obtidos para o par de picos 1c e 1a, referentes à redução eletroquímica de 1,0 mmol L ⁻¹ de ET em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	132
Tabela 10 - Parâmetros voltamétricos obtidos para o segundo pico voltamétrico relativo à redução da de 1,0 mmol L ⁻¹ de ET em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	138
Tabela 11 - Parâmetros analíticos obtidos com as técnicas LSV, DPV e SWV para a determinação de ET em ACN/TBABF ₄ 0,1 mol L ⁻¹	158
Tabela 12 - Resultados da determinação de ET na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos.	161
Tabela 13 - Parâmetros voltamétricos determinados para a redução eletroquímica de 0,5 mmol L ⁻¹ de ET na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v).....	166
Tabela 14 - Parâmetros analíticos obtidos com as técnicas LSV, DPV e SWV para a determinação de ET em meio misto.	174
Tabela 15 - Resultados da determinação de ET na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos em meio misto.	176

Sumário

1 - Introdução	21
1.1 - Amebíase	22
1.2 - Quimioterápicos antiamebíacos.....	25
1.3 - Métodos analíticos para a determinação de dicloroacetamidas antiamebíacas	27
1.4 - Comportamento eletroquímico de compostos estruturalmente semelhantes às dicloroacetamidas antiamebíacas.....	31
1.4a - Redução eletroquímica de compostos halogenados.....	31
1.4b - Redução eletroquímica de compostos contendo o grupo nitro	43
1.4c - Redução eletroquímica de amidas	45
2 - Objetivos	46
3 - Procedimento Experimental.....	48
3.1 - Reagentes e soluções	49
3.2 - Experimentos voltamétricos	50
3.3 - Experimentos amperométricos	50
3.4 - Eletrólises a potencial controlado.....	51
3.5 - Isolamento e identificação dos produtos eletrogerados.....	52
3.6 – Desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos.....	54
4 - Resultados e Discussão.....	56
4.1 - Furoato de diloxanida (FD)	57
4.1a - Experimentos voltamétricos.....	57
4.1b - Eletrólises a potencial controlado	65
4.1c - Identificação dos produtos de eletrólise do FD.....	69
4.1d - Métodos eletroanalíticos para a determinação de FD.....	82
4.2 - Teclozan (TEC)	92
4.2a - Experimentos voltamétricos.....	92
4.2b - Eletrólises a potencial controlado	96
4.2c - Identificação dos produtos de eletrólise do TEC	100
4.2d - Métodos eletroanalíticos para a determinação de TEC.....	115
4.3 - Etofamida (ET)	128
4.3a - Estudo da redução eletroquímica da ET em meio de ACN	128
4.3a.1 - Experimentos voltamétricos	128
4.3a.2 - Eletrólises a potencial controlado.....	140
4.3a.3 - Identificação dos produtos de eletrólise da ET	145

4.3a.4 - Métodos eletroanalíticos para a determinação da ET	155
4.3b - Estudo da redução eletroquímica da ET em meio misto.....	162
4.3b.1 - Experimentos voltamétricos	162
4.3b.2 - Eletrólises a potencial controlado.....	171
4.3b.3 - Métodos eletroanalíticos para a determinação da ET	173
5 - Conclusões.....	178
6 - Referências.....	181

1 - Introdução

As doenças parasitológicas estão entre os mais freqüentes agravos infecciosos do mundo, merecendo destaque os parasitas que se alojam no trato gastrointestinal, denominados enteroparasitas. As enteroparasitoses, de modo geral, causam sangramento intestinal e afetam o equilíbrio nutricional, interferindo na absorção de nutrientes e reduzindo a ingestão alimentar. Assim, as vítimas das enteroparasitoses, em estágio avançado, freqüentemente apresentam grave estado de subnutrição [1].

Desta maneira, tais doenças influenciam negativamente no crescimento e desenvolvimento cognitivo da população infantil, além de contribuir para o baixo rendimento escolar infanto-juvenil e para a inadequada produtividade no trabalho da população adulta. A incidência de infecções parasitológicas torna-se maior em regiões socioeconomicamente menos favorecidas. As enteroparasitoses ocorrem com elevada incidência e variedade em países da Ásia, África e América do Sul sendo, portanto, englobadas no grupo das doenças tropicais [1].

O Brasil reúne fatores que propiciam a disseminação das enteroparasitoses, sendo observada elevada incidência destas doenças mesmo em regiões com alto índice de urbanização e industrialização. O crescimento acelerado dos centros urbanos brasileiros favoreceu o estabelecimento de comunidades marginais convivendo em ambientes sem a mínima infra-estrutura sanitária, criando assim, condições ideais para o desenvolvimento e disseminação de enteroparasitas [1].

1.1 - Amebíase

A amebíase, doença causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, é uma enteroparasitose que merece atenção particular. Estima-se que, anualmente, o número de mortes decorrentes da amebíase esteja entre 40.000 e 100.000, considerando toda a população mundial [2,3], o que a coloca em segundo lugar em termos de mortes causadas por protozoários.

A transmissão da amebíase ocorre por intermédio de cistos eliminados com as fezes de indivíduos contaminados. A principal forma de veiculação destes cistos é a contaminação da água e de alimentos com as fezes de indivíduos infectados [4]. Assim como observado para as demais enteroparasitoses, a incidência da amebíase é maior em países em desenvolvimento, os quais freqüentemente apresentam infra-estrutura sanitária muito debilitada. Desta maneira,

a amebíase é também uma doença englobada no grupo das doenças tropicais. Em países desenvolvidos, imigrantes ou indivíduos que tenham viajado para regiões endêmicas representam a principal forma de veiculação da amebíase [4].

Ao atingir o intestino delgado, os cistos evoluem a trofozoítos, forma adulta da ameba. Após sua multiplicação, os trofozoítos podem se alojar na superfície da mucosa do intestino grosso, onde se alimentam de muco, da fauna e flora intestinal, estabelecendo uma relação de comensalismo entre a *Entamoeba histolytica* e o hospedeiro. Esta situação caracteriza a denominada colonização não invasiva, sendo que, nestas condições, o hospedeiro não apresenta qualquer sintoma. Eventualmente, os trofozoítos podem penetrar na parede intestinal transformando-se efetivamente em uma forma invasora causando infecção intestinal. Após terem penetrado na parede intestinal, os trofozoítos se multiplicam e passam a se alimentar de células vivas, como as hemácias. Neste estágio, há formação de lesões necróticas que acarretam na formação de úlceras, denominadas úlceras amebianas. Nesta situação, o hospedeiro apresenta dores abdominais intensas e disenteria aguda, com presença de sangue e muco em suas fezes. Quando os trofozoítos atravessam a parede intestinal podem atingir vasos sanguíneos, sendo transportados pela circulação, atingindo outros órgãos, tais como, fígado, pulmões e cérebro, onde se multiplicam e originam as infecções amebianas extra-intestinais.

Quando as condições locais tornam-se desfavoráveis à viabilidade dos trofozoítos, estes evoluem para uma forma denominada pré-cística. A maturação da forma pré-cística para a forma de cistos e sua eliminação com as fezes do hospedeiro promove a continuidade do ciclo de vida da *Entamoeba histolytica*, o qual é esquematicamente representado na Figura 1.

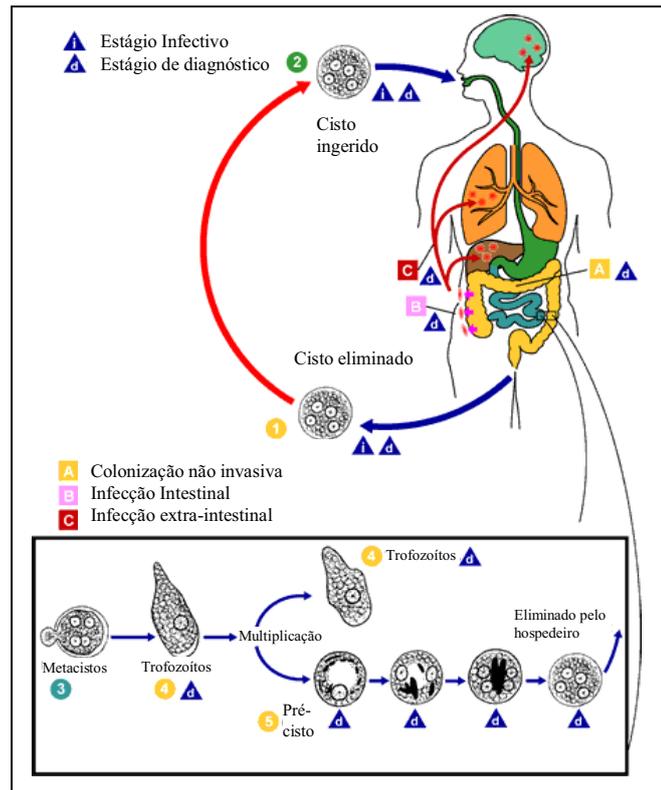


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida da *Entamoeba histolytica*. Adaptado da referência [5].

O quadro clínico das pessoas acometidas pela *Entamoeba histolytica* é caracterizado por manifestações disentéricas agudas e/ou crônicas [6,7]. Em muitos casos, no entanto, indivíduos infectados não desenvolvem qualquer sintoma, caracterizando um estado assintomático. Em 1993 uma nova espécie de entamoeba, a *Entamoeba dispar*, foi identificada [2], esta espécie é morfológicamente idêntica a *Entamoeba histolytica*, porém incapaz de causar infecção. A *Entamoeba dispar* é responsável por grande parte dos casos de infecção assintomática, os quais, erroneamente, acreditava-se serem exclusivamente devido a *Entamoeba histolytica* [8]. Atualmente, existem métodos bem estabelecidos para a diferenciação entre as duas espécies de entamoeba [4,9,10]. Embora a *Entamoeba dispar* esteja presente em grande parte de indivíduos assintomáticos, são relatados muitos casos de infecção com a *Entamoeba histolytica* sem o desenvolvimento de qualquer sintoma. Os fatores que determinam na amebíase o comensalismo inofensivo ou a infecção invasiva ainda não são bem conhecidos.

Apesar da alta prevalência da amebíase, esta é relegada a um segundo plano tanto por países desenvolvidos como pelos subdesenvolvidos onde a incidência é elevada, a

comunidade médica e científica considera, indevidamente, a amebíase como uma doença de baixa prioridade. Para o controle desta doença, deve-se primeiramente tratar adequadamente tanto os doentes quanto os portadores assintomáticos. O papel de pessoas infectadas na transmissão da amebíase deve ser esclarecido, com intuito de conscientizar os doentes da importância de um maior cuidado com o destino de excrementos e de uma maior atenção com a higiene pessoal.

1.2 - Quimioterápicos antiamebíacos

Indivíduos infectados com a *Entamoeba histolytica* podem ser facilmente curados por meio de tratamento com agentes quimioterápicos, os quais estão disponíveis em grande variedade e, segundo o lugar onde atuam, podem ser divididos em dois grandes grupos: amebicidas de contato ou luminais e amebicidas teciduais. Os amebicidas luminais atuam diretamente no intestino sendo, portanto, efetivos para o tratamento da amebíase intestinal, agindo diretamente no local da infecção. Os amebicidas teciduais exercem sua ação em tecidos, sendo os efeitos sentidos em diferentes localidades do organismo, tais como, fígado, pulmões e sistema nervoso; este tipo de medicamento, conseqüentemente, é indicado para a amebíase extra-intestinal.

O metronidazol é um dos mais eficientes fármacos antiamebíacos e por exercer ação tanto luminal como tecidual foi considerado o medicamento mais adequado tanto para o tratamento da amebíase intestinal quanto para a extra-intestinal. Embora o metronidazol apresente grande eficácia no tratamento da amebíase, tem sido observado que este fármaco exerce efeitos mutagênicos em bactérias e é carcinogênico para roedores [11]. Estas observações têm levado a substituição do metronidazol por outros fármacos com menor toxicidade.

Dentre os fármacos alternativos ao metronidazol, destacam-se as dicloroacetamidas, as quais apresentam elevada eficiência no tratamento da amebíase, e poucos efeitos colaterais. Os principais representantes desta classe de fármacos são: furoato de diloxanida, teclozan, e etofamida cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 2.

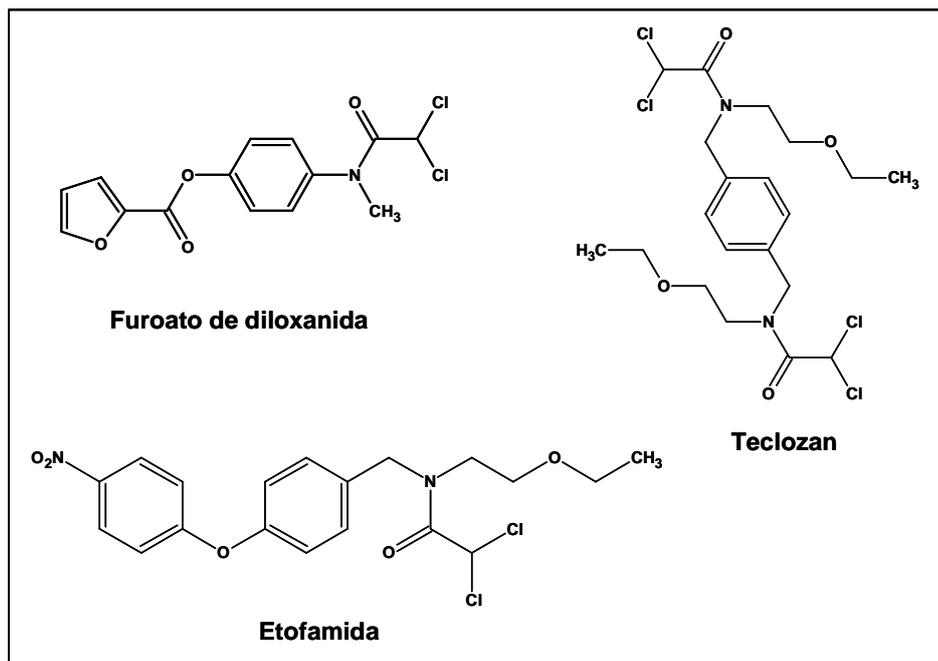


Figura 2 - Estruturas moleculares dos principais fármacos da classe das dicloroacetamidas.

As dicloroacetamidas em geral são bem toleradas, sendo os principais efeitos adversos associados a estes medicamentos restritos a desconfortos gastrintestinais, incluindo náuseas e vômitos [12].

O furoato de diloxanida é um medicamento também de ação luminal, sendo considerado o medicamento de escolha para o tratamento de indivíduos assintomáticos que estejam eliminando cistos [13,14]. O teclozan é um medicamento de ação luminal empregado preferencialmente em casos de amebíase intestinal aguda, tratamentos com este amebicida apresentam elevado índice de cura, em média superior a 80 % [11]. A etofamida é um medicamento que apresenta tanto ação luminal como tecidual, apresentando grande eficácia tanto em infecções intestinais como extra-intestinais [12].

Pouco se conhece sobre os mecanismos de ação das dicloroacetamidas antiamebíacas. O furoato de diloxanida é um derivado da diloxanida, que é a espécie efetivamente ativa contra a amebíase. Estudos sobre a atividade antiamebíaca da diloxanida constataram que esta apresenta elevada eficiência no tratamento de indivíduos assintomáticos, no entanto, observou-se que a diloxanida é ineficaz em casos de infecções agudas. Este fato foi atribuído à presença de baixas concentrações de diloxanida nos locais de infecção. Diversos derivados da diloxanida foram testados com o objetivo de se aumentar a concentração desta substância nos locais infectados, o éster furoato foi o que apresentou melhores resultados [15]. Antes da

absorção, o furoato de diloxanida é hidrolisado formando ácido furóico e liberando a diloxanida [15]. Sabe-se que o furoato de diloxanida é absorvido no trato intestinal e que sua principal forma de excreção é através da urina.

Sobre a etofamida sabe-se que, aparentemente, não é absorvida no trato gastrintestinal, a principal forma de excreção deste fármaco é através das fezes [11]. Têm sido observadas altas concentrações de etofamida nas fezes de indivíduos submetidos a tratamento com dose única de 200 mg, a presença do fármaco é observada mesmo após 3 dias da administração da dose. Sobre o teclozan não são encontradas informações na literatura sobre as etapas metabólicas sofridas por este fármaco quando presente no organismo humano.

1.3 - Métodos analíticos para a determinação de dicloroacetamidas antiamebíacas

Quanto aos métodos analíticos para a quantificação de dicloroacetamidas antiamebíacas, as informações disponíveis na literatura são escassas. As farmacopéias britânica [16] e norte americana [17] não apresentam monografias oficiais para o teclozan e para a etofamida, portanto, não são encontrados métodos analíticos oficiais para a quantificação destes dois fármacos. O furoato de diloxanida é o único representante das dicloroacetamidas antiamebíacas para o qual ambas as farmacopéias apresentam metodologia analítica oficial. A metodologia preconizada por estas farmacopéias para análise deste fármaco envolve uma titulação em meio não aquoso. O procedimento consiste na dissolução do furoato de diloxanida em piridina anidra e titulação com hidróxido de tetrabutylamônio, sendo o ponto de equivalência determinado potenciométricamente. A literatura apresenta também metodologias alternativas para a quantificação de furoato de diloxanida, as quais são baseadas exclusivamente em técnicas espectrofotométricas [18- 22] e cromatográficas [23- 26].

Al-Ghanam e Belal [18] propuseram uma metodologia para a quantificação de furoato de diloxanida em formulações farmacêuticas baseada na técnica de espectrofotometria. O método é baseado na reação deste fármaco com KMnO_4 em meio de NaOH , um dos produtos de reação possui coloração verde azulada e pôde ser detectado em 610 nm. O método apresentou um intervalo linear com a concentração de furoato de diloxanida no intervalo de 2,5 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção igual a 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O método foi aplicado para a quantificação de furoato de diloxanida em formulações farmacêuticas, sendo os resultados

concordantes com os obtidos com a metodologia oficial. Neste trabalho, foi realizado ainda um estudo das reações químicas envolvidas no método analítico desenvolvido. Os autores concluíram que o furoato de diloxanida sofre hidrólise alcalina, gerando como produtos o ácido furóico e a diloxanida, cujo grupo fenólico é oxidado pelo permanganato que se reduz a manganato, sendo esta a espécie efetivamente analisada em 610 nm.

A técnica de espectrofotometria derivativa foi utilizada por Daabees [19] para a análise de furoato de diloxanida em presença de diloxanida, que é um de seus metabólitos. A determinação do fármaco na presença de seu metabólito foi possível, pois o autor observou que a segunda derivada do espectro de absorção do furoato de diloxanida exibe um máximo em 260 nm, enquanto a segunda derivada do espectro da diloxanida exibe um valor próximo à zero neste mesmo comprimento de onda. O método desenvolvido foi empregado com êxito para a quantificação de furoato de diloxanida em amostras comerciais de formulações farmacêuticas e em amostras enriquecidas com diloxanida, sendo os resultados obtidos concordantes com os obtidos pela metodologia oficial para a quantificação de furoato de diloxanida.

Prasad et al. [20] também utilizaram a técnica de espectrofotometria derivativa para desenvolver um método para determinação simultânea de tinidazol, furazolidona e furoato de diloxanida. Os autores verificaram que os espectros de absorção dos três fármacos apresentaram bandas que se sobrepunham, impossibilitando a determinação simultânea. Foi observado, entretanto, que utilizando a segunda derivada do espectro de absorção dos três fármacos obtém-se um espectro bem resolvido, possibilitando, assim, a quantificação simultânea. O método desenvolvido apresentou uma resposta linear com a concentração de furoato de diloxanida no intervalo de 2,5 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O método foi aplicado para a determinação simultânea de tinidazol, furazolidona e furoato de diloxanida em formulações farmacêuticas que utilizam a associação destes três fármacos como princípio ativo. Foram realizados estudos de adição e recuperação, sendo obtidas porcentagens de recuperação próximas a 100 % para os três fármacos.

El-Gizawy [23] desenvolveu uma metodologia analítica para a determinação simultânea de furoato de diloxanida e metronidazol baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O autor utilizou como fase estacionária uma coluna cromatográfica contendo β -ciclodextrina e como fase móvel foi empregada uma mistura metanol:tampão

fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) (65:35 v/v). Ambos os fármacos foram detectados espectrofotometricamente em 254 nm. Os picos cromatográficos apresentaram boa resolução e separação entre o furoato de diloxanida e o metronidazol, permitindo a quantificação simultânea. O autor verificou um intervalo linear da área do pico cromatográfico em função da concentração de furoato de diloxanida no intervalo de 1 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo observado para o metronidazol um intervalo linear de 1 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método proposto foi aplicado com êxito para a quantificação simultânea destes fármacos em amostras de formulações farmacêuticas que utilizam a associação destes fármacos como princípio ativo, sendo observado que os demais componentes da formulação farmacêutica não interferem nas análises. Estudos de adição e recuperação forneceram porcentagens de recuperação entre 99,6 e 101,3 %.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência também foi utilizada por Hasan et al. [24] para desenvolver uma metodologia para a quantificação de furoato de diloxanida em presença de seus produtos de degradação, os quais foram obtidos adicionando-se o fármaco a uma solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ seguida por aquecimento sob refluxo por 3 h. Posteriormente, a solução foi resfriada, sendo observada a precipitação da 4-hidróxi-N-metil anilina. Após filtração e separação deste produto de degradação, o filtrado foi acidificado com ácido sulfúrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ promovendo a precipitação de outro produto de degradação, o ácido furóico. Após a remoção deste composto por filtração, o último produto de degradação, o ácido dicloroacético permaneceu no filtrado. Os produtos de degradação obtidos foram utilizados para preparar soluções estoques, as quais foram empregadas para a quantificação de furoato de diloxanida em presença de seus produtos de degradação. Para a análise destas amostras, os autores utilizaram como fase estacionária uma coluna C-18 e como fase móvel foi utilizada uma mistura metanol:água (80:20 v/v). A detecção foi realizada espectrofotometricamente em 258 nm. Foi verificado um intervalo linear da área do pico cromatográfico com a concentração de furoato de diloxanida no intervalo de 2 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção de $0,65 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os autores verificaram que os produtos de degradação não interferem na determinação do furoato de diloxanida pelo método proposto. O método foi aplicado com êxito para a determinação de furoato de diloxanida em diferentes formulações farmacêuticas. Estudos de adição e recuperação forneceram porcentagens de recuperação próximas a 100 % para todas as amostras analisadas.

Mishal e Sober [26] utilizaram a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para desenvolver um método analítico para a determinação simultânea de furoato de diloxanida e benzoato de metronidazol, cuja combinação é utilizada como princípio ativo de formulações farmacêuticas empregadas no tratamento de amebíase e giardíase. Adicionalmente, o método proposto permitiu a determinação simultânea destes fármacos em presença de metil-parabeno e propil-parabeno, os quais atuam como conservantes das formulações farmacêuticas comerciais. Os autores empregaram como fase estacionária uma coluna C-18 e como fase móvel foi utilizada uma mistura acetonitrila:tampão fosfato (30:70 v/v) em uma vazão de 2,0 mL min⁻¹. A detecção foi realizada espectrofotometricamente em 260 nm. O método permitiu a determinação de furoato de diloxanida na presença de benzoato de metronidazol e dos conservantes. Os autores obtiveram um intervalo linear com a concentração de furoato de diloxanida no intervalo de 0,16 a 0,95 mg mL⁻¹. O método desenvolvido foi empregado com êxito para a determinação de furoato de diloxanida e benzoato de metronidazol em formulações farmacêuticas, sendo constatado que os excipientes não exercem qualquer interferência.

Na literatura, não são encontrados registros de trabalhos propondo métodos analíticos para a quantificação de teclozan ou da etofamida. Apesar de incluírem diferentes técnicas analíticas, os métodos citados anteriormente para a quantificação de furoato de diloxanida se baseiam exclusivamente na detecção espectrofotométrica deste fármaco. Assim, a determinação de dicloroacetamidas com atividade antiamebíaca por técnicas eletroanalíticas, ou mesmo o estudo do comportamento eletroquímico destes fármacos é um campo ainda pouco explorado. Recentemente, parte dos resultados provenientes deste projeto de pesquisa foi publicada, sendo o primeiro registro na literatura sobre o comportamento eletroquímico do furoato de diloxanida, bem como do desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para sua determinação [27].

As técnicas eletroquímicas são ferramentas analíticas versáteis e sensíveis, permitindo a detecção de baixas concentrações do analito com um custo instrumental relativamente baixo, sendo a utilização destas técnicas para a análise de fármacos em diferentes matrizes assunto de diferentes artigos de revisão [28,29]. Apesar da importância das técnicas eletroquímicas no estudo dos mecanismos redox, bem como no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a quantificação de fármacos, não são encontrados trabalhos na literatura

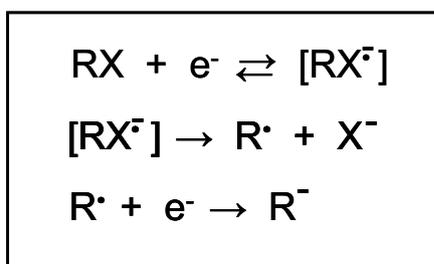
onde tais técnicas são empregadas no estudo de dicloroacetamidas com atividade antiamebíaca, assim, a realização de tais estudos é de significativa relevância.

1.4 - Comportamento eletroquímico de compostos estruturalmente semelhantes às dicloroacetamidas antiamebíacas

Conforme descrito anteriormente, a literatura não apresenta estudos sobre o comportamento eletroquímico das dicloroacetamidas antiamebíacas, entretanto, trabalhos sobre o comportamento eletroquímico de compostos estruturalmente semelhantes servem como um suporte inicial para o estudo do comportamento eletroquímico destes fármacos. O principal centro eletroativo presente nas diferentes dicloroacetamidas estudadas são as suas ligações C-Cl, as quais podem ser eletroquimicamente reduzidas. Adicionalmente, a etofamida apresenta em sua estrutura um grupo nitro, cuja redução eletroquímica tem sido amplamente estudada. Além destes grupos, outra classe de compostos cuja redução eletroquímica está diretamente relacionada ao objeto de estudo deste trabalho são as amidas.

1.4a - Redução eletroquímica de compostos halogenados

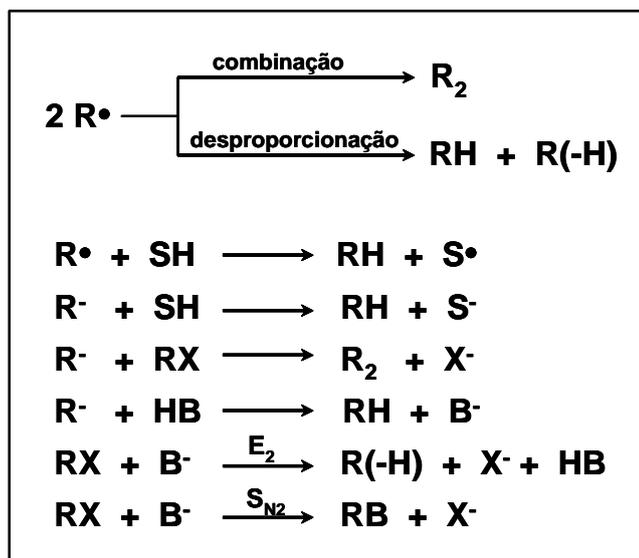
De acordo com o mecanismo clássico para a redução de compostos halogenados, este processo envolve a quebra da ligação C-Cl em um processo bieletrônico. O primeiro elétron é responsável pela formação de um ânion-radical com subsequente quebra da ligação C-Cl, formando cloreto e o respectivo radical desalogenado, enquanto o segundo elétron promove a redução deste radical, gerando o respectivo carbânion [30]. Este processo é ilustrado pela seqüência reacional apresentada no Esquema 1.



Esquema 1 - Mecanismo proposto para a quebra redutiva da ligação C-X de um alceno monohalogenado [30].

Freqüentemente, o potencial de redução do radical eletrogerado é mais positivo do que o do composto halogenado inicial, portanto, o radical é reduzido ao carbânion imediatamente após sua formação. Conseqüentemente, a redução eletroquímica da maioria dos compostos halogenados origina um único pico voltamétrico envolvendo a transferência de dois elétrons. Entretanto, algumas exceções a este comportamento têm sido observadas na literatura. Nestes casos, o radical eletrogerado é mais difícil de se reduzir do que o composto halogenado inicial, portanto, a redução eletroquímica destes compostos origina dois picos voltamétricos, cada um envolvendo a transferência de um elétron formando, consecutivamente, o radical desalogenado e o respectivo carbânion [31].

Após a formação do radical (R^\bullet) ou do carbânion (R^-), estas espécies podem sofrer uma série de reações químicas, conforme ilustrado no Esquema 2.



Esquema 2 - Reações químicas envolvendo o radical ou o carbânion eletrogerado na quebra redutiva de uma ligação C-X [30].

Assim, via radicais alquil ou carbânions eletrogerados, é possível a obtenção de dímeros (R_2), alcanos (RH) ou olefinas [$R(-H)$]. Além disso, o carbânion formado pode abstrair um próton de um ácido fraco (HB), originando um alcano e a base conjugada do ácido, a qual pode reagir com o material de partida (RX) via um mecanismo E_2 ou S_{N2} . Também é possível que o solvente (S) atue como um doador de um átomo de hidrogênio ou de um próton, promovendo a hidrogenação do radical eletrogerado ou a protonação do carbânion. Desta maneira, compostos halogenados podem ser utilizados como material de

partida para eletrossíntese de diversos compostos. As reações químicas envolvendo o radical eletrogerado podem competir com sua redução ao carbânion, podendo, dependendo da cinética destas reações, até mesmo suprimir a segunda transferência eletrônica da redução de um composto halogenado.

Apesar da seqüência reacional apresentada no Esquema 1 ser, em geral, bem aceita, a existência do ânion-radical formado após a primeira transferência eletrônica nunca foi demonstrada [30]. Andrieux et al. [32] apresentaram uma completa discussão explicando as razões pelas quais esta espécie não deve se formar durante a redução de haletos alifáticos. De acordo com estes autores, a redução eletroquímica destes compostos ocorre como uma etapa elementar, na qual a transferência eletrônica e a quebra da ligação ocorrem conjuntamente, conforme ilustrado no Esquema 3.



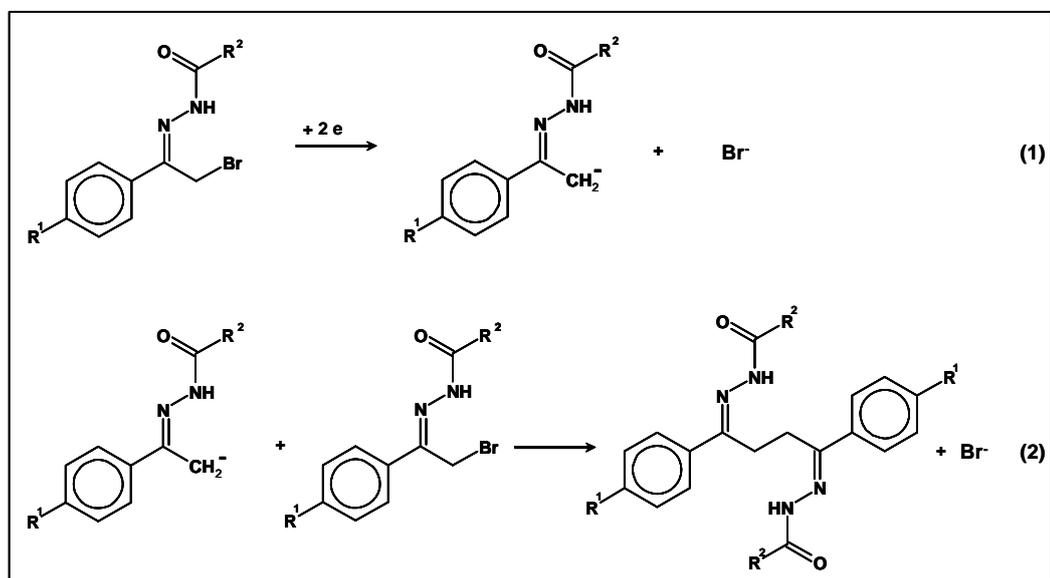
Esquema 3 - Quebra redutiva de uma ligação C-X segundo um mecanismo no qual a transferência eletrônica e quebra de ligação ocorrem conjuntamente.

Por outro lado, segundo aqueles autores, a redução eletroquímica de haletos aromáticos ocorre seqüencialmente, conforme ilustrado no Esquema 1 e que, portanto, o ânion-radical é um intermediário efetivo da redução eletroquímica de haletos aromáticos. Transferências eletrônicas acompanhadas por quebra de ligações, também chamadas de transferências eletrônicas dissociativas têm sido amplamente estudadas na literatura, sendo assunto de diferentes artigos de revisão [33,34]. A literatura apresenta também várias discussões sobre o mecanismo seqüencial (Esquema 1) e o que considera a transferência eletrônica e quebra de ligação ocorrendo conjuntamente [35,36], incluindo critérios para diagnosticar a transição entre ambos os mecanismos [37-39].

De maneira geral, verifica-se que compostos halogenados sofrem redução eletroquímica por meio da quebra redutiva da ligação C-X, independentemente de sua estrutura química. Este comportamento tem sido observado para compostos poli-halogenados, haletos aromáticos, alcanos, alcenos e alcinos halogenados [30]. Embora a estrutura química de um composto halogenado não altere a essência de sua redução eletroquímica (quebra redutiva da ligação C-X), este parâmetro influencia fortemente a natureza química dos

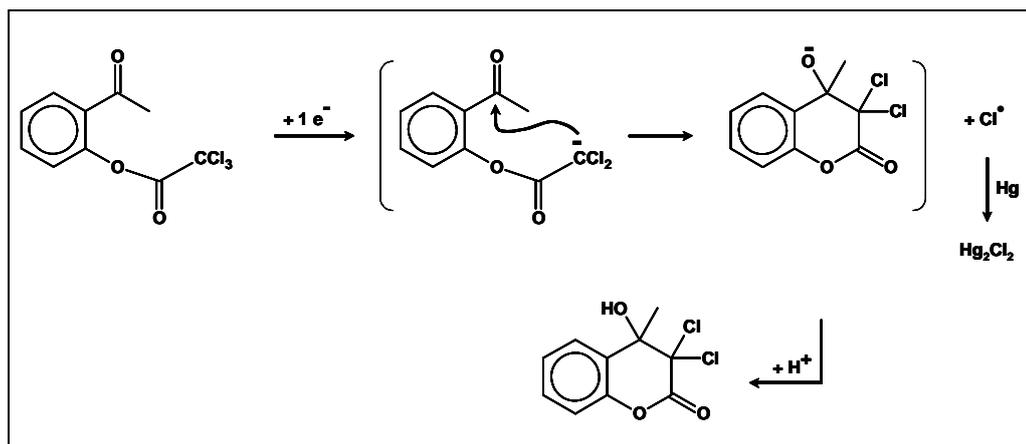
produtos formados, possibilitando ou impedindo reações de condensação ou ciclização, após as etapas de transferência eletrônica.

Batanero et al. [40] estudaram a redução eletroquímica de diferentes brometos de acilhidrazonas em meio de dimetilformamida utilizando mercúrio como material eletrodico. Os autores verificaram que a redução eletroquímica destas espécies envolve a quebra da ligação C-Br em um processo envolvendo dois elétrons, formando o respectivo carbânion e o íon brometo. Posteriormente, o material de partida sofre um ataque nucleofílico do carbânion eletrogerado, formando um composto dimérico. As etapas reacionais propostas pelos autores são apresentadas no Esquema 4.



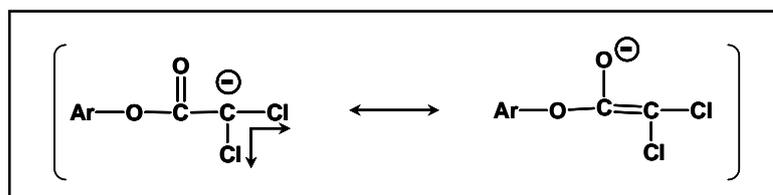
Esquema 4 - Sequência reacional para a redução eletroquímica de diferentes brometos de acilhidrazonas [40].

Uma seqüência reacional distinta foi observada para a redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato, neste caso, Batanero e Barba [41] observaram que o carbânion eletrogerado não sofre uma reação de dimerização, mas sim uma ciclização intramolecular seguida de uma protonação, formando como produto de eletrólise a espécie 3,3-dicloro-4-hidróxi-4-metil-3,4-diidrocumarina, conforme apresentado no Esquema 5.



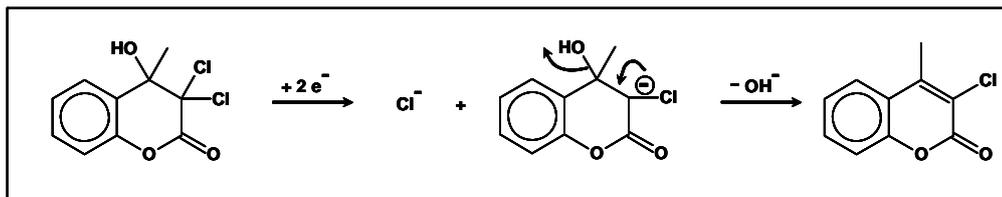
Esquema 5 - Mecanismo para a primeira etapa da redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].

Neste trabalho, os autores estudaram a redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato em meio de acetonitrila utilizando um poço de mercúrio como cátodo. Os autores verificaram que a primeira etapa da redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato envolve apenas um elétron por molécula. Baseados nesta informação, os autores concluíram que após a transferência eletrônica formam-se a espécie Cl^\bullet e o respectivo carbânion, o qual é fortemente estabilizado, de acordo com o apresentado no Esquema 6.



Esquema 6 - Estabilização do carbânion eletrogerado pela redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].

Os autores verificaram ainda, que em potenciais mais negativos a espécie 3,3-dicloro-4-hidróxi-4-metil-3,4-diidrocumarina sofre uma segunda redução eletroquímica em um processo envolvendo uma nova quebra de uma ligação C-Cl, o qual consome 2 elétrons por molécula, originando como produto a espécie 3-cloro-4-metilcumarina, conforme mostra o Esquema 7.

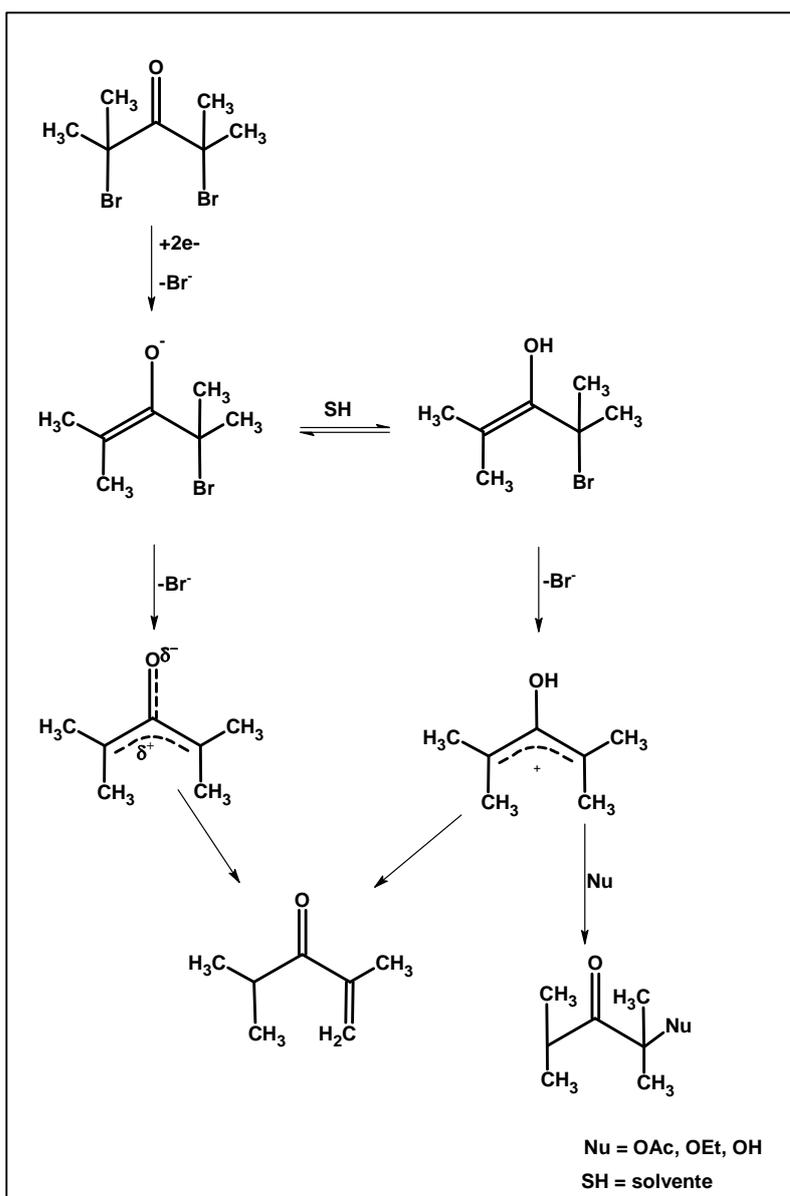


Esquema 7 - Seqüência reacional para a segunda etapa da redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41].

Conforme a discussão apresentada no início desta seção, a transferência de apenas um elétron na quebra redutiva de ligações C-Cl não implica necessariamente na formação da espécie Cl^\bullet e no respectivo carbânion, conforme afirmado por Batanero e Barba [41]. De acordo com o Esquema 2, o radical eletrogerado pode sofrer reações secundárias, tais como: combinação, desproporcionamento ou hidrogenação. Estas reações secundárias, portanto, podem consumir o radical eletrogerado suprimindo a segunda transferência eletrônica. Assim, a possibilidade de que na redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato a 3,3-dicloro-4-hidróxi-4-metil-3,4-diidrocurarina (Esquema 5), a espécie sofrendo ciclização seja o radical eletrogerado, e não o carbânion, não pode ser descartada, pois a presença da espécie Cl^\bullet , ou a ausência do íon cloreto na solução eletrolisada não foi efetivamente demonstrada.

De maneira análoga ao constatado para a redução eletroquímica do 2-acetilfeniltricloroacetato [41], tem sido observado que a redução eletroquímica de outros compostos α -halocarbonílicos também envolve a quebra redutiva da ligação C-X, sendo a natureza química dos produtos formados muito dependente da estrutura do composto α -halocarbonílico. Dirlam et al. [42] estudaram a redução eletroquímica da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona sobre mercúrio em dimetilformamida contendo tampão acetato. Os autores verificaram que, nestas condições experimentais, o principal produto de eletrólise foi a 2-acetóxi-2,4-dimetil-3-pentanona. Segundo os autores, a adição do grupo acetóxi ocorre após a ruptura das duas ligações C-Br. Eletrólises da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona, em meio de acetonitrila contendo etanol como espécie nucleofílica, forneceram como principal produto a 2-etóxi-2,4-dimetil-3-pentanona. A realização de eletrólises da halocetona estudada em meio de DMF contendo água como espécie nucleofílica mostrou um comportamento mais complexo, sendo possível identificar como principais produtos a 2-hidróxi-2,4-dimetil-3-pentanona e a 2,4-dimetilpent-1-en-3-ona, nestes experimentos, o derivado desalogenado da halocetona estudada não se formou. Os estudos em presença de

diferentes nucleófilos demonstraram a ocorrência de reações de adição nucleofílica ao intermediário reacional eletrogerado. Para todas as condições experimentais adotadas, os autores observaram que a redução da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona envolve dois elétrons por molécula, sugerindo que uma das ligações C-Br é quebrada química e não eletroquimicamente. Baseados nestes resultados experimentais, os autores propuseram que a redução eletroquímica da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona ocorre segundo a seqüência reacional apresentada no Esquema 8.



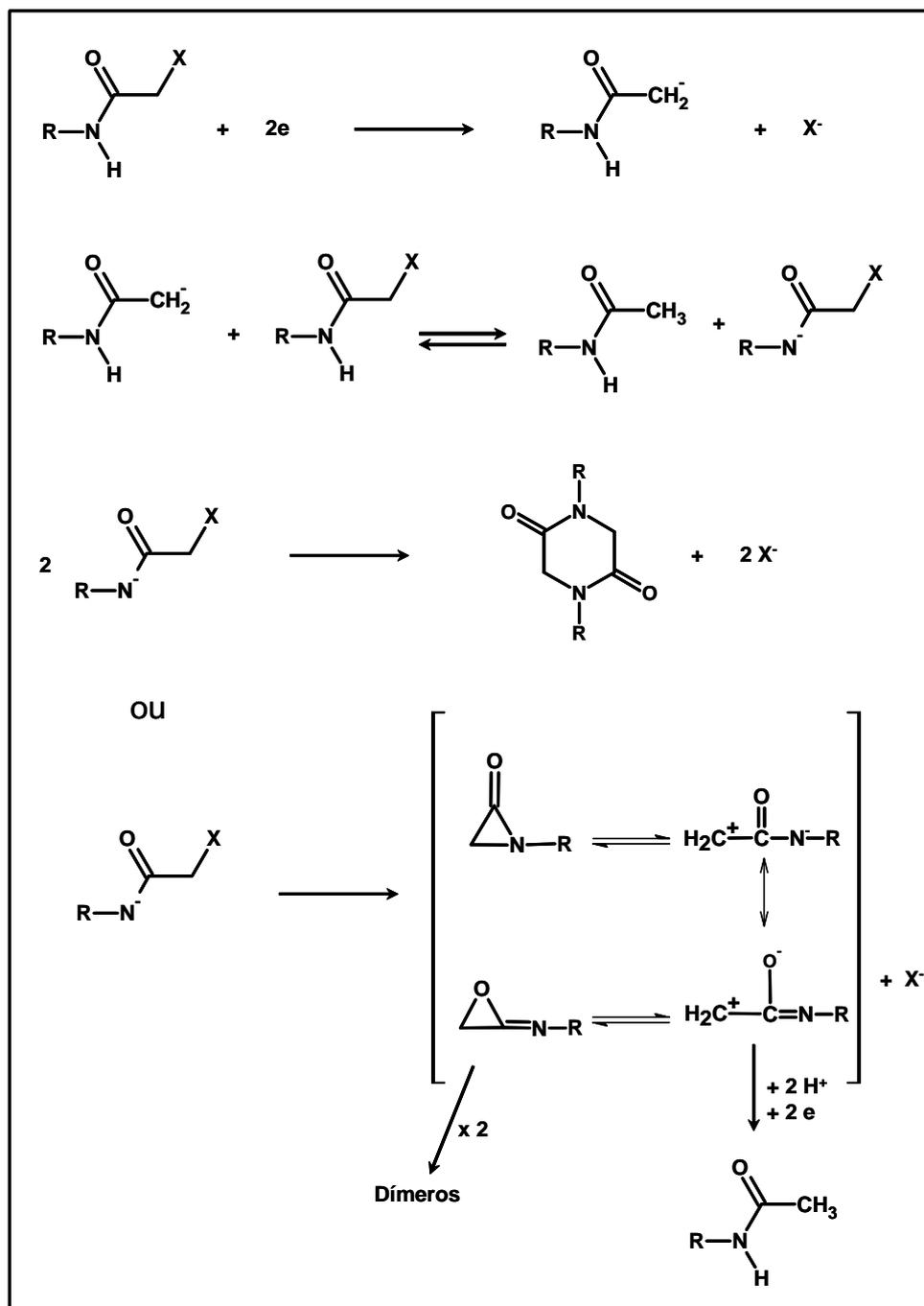
Esquema 8 - Seqüência reacional para a redução eletroquímica da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona [42].

A seqüência reacional proposta por Dirlam et al. [42] explica adequadamente tanto os produtos identificados quanto o fato de ser observada a transferência de apenas dois elétrons para a quebra de duas ligações C-Br. Adicionalmente, os autores descartaram a possibilidade da ocorrência da quebra eletroquímica de uma das ligações C-Br da 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona seguida por uma substituição nucleofílica. Esta informação foi obtida por meio de um “experimento controle” no qual a 2-bromo-2,4-dimetil-3-pentanona foi mantida em presença de acetato sem a aplicação de potencial. Nestas condições experimentais, os autores observaram que a 2-acetóxi-2,4-dimetil-3-pentanona não foi formada, mostrando que a 2-bromo-2,4-dimetil-3-pentanona não é susceptível a substituição nucleofílica pelo acetato.

Fry e O’Dea [43] estudaram a redução eletroquímica de diferentes α,α' -dibromocetonas sobre mercúrio em meio de ácido acético. Tais estudos foram realizados com o objetivo de se desenvolver uma rota eletrossintética para a obtenção de α -acetóxi-cetonas ramificadas. Os resultados obtidos permitiram aos autores verificar que o grau de ramificação da cetona exerce influência sobre a natureza química dos produtos formados em sua redução eletroquímica. Foi observado que α,α' -dibromocetonas ramificadas, tais como a 2,4-dibromo-2,4-dimetil-3-pentanona, sofrem redução originando α -acetóxi-cetonas com elevado rendimento e pureza. Entretanto, a redução eletroquímica de cetonas menos ramificadas, tais como a 4,6-dibromo-5-nonona, fornece como principal produto as respectivas cetonas desalogenadas. Para as diferentes dibromocetonas estudadas, os autores verificaram a transferência de aproximadamente dois elétrons por molécula ($n = 1,48 - 2,18$), sugerindo que a redução eletroquímica destas dibromocetonas, envolve uma seqüência reacional semelhante à proposta por Dirlam et al. [42] (Esquema 8). Em outro trabalho, Fry e Anderson [44] estudou a redução eletroquímica da bis(α -bromociclopropil)-metanona sobre mercúrio. Tais estudos foram realizados a potencial controlado ($-0,85$ V vs. ECS) em meio de tampão acetato $1,0$ mol L⁻¹. O autor verificou que os produtos formados pela redução eletroquímica da bis(α -bromociclopropil)-metanona em presença de acetato não são acetóxi-cetonas como observado para outras dihalocetonas. Foi observado que, em meio de tampão acetato, os principais produtos formados pela redução da bis(α -bromociclopropil)-metanona são α -bromociclopropil-ciclopropil-metanona (76 %) e diciclopropil-metanona (14 %). Em meio de uma mistura de dimetilformamida/tampão acetato (9:1 v/v), o autor verificou que o único produto formado foi a α -bromociclopropil-ciclopropil-metanona. Assim, constatou-se

que, ao contrário do observado para outras dihalocetonas, o produto da redução eletroquímica da bis(α -bromociclopropil)-metanona ainda possui um átomo de bromo. Segundo o autor, o grupo ciclopropil dificulta a ruptura da ligação C-Br, o que explica a presença desta ligação no produto da redução eletroquímica da bis(α -bromociclopropil)-metanona em meio misto.

Resultados semelhantes têm sido obtidos no estudo da redução eletroquímica de haloacetamidas. Casadei et al. [45] estudaram a redução eletroquímica de diferentes bromoacetamidas e cloroacetamidas N-substituídas sobre mercúrio em meio de dimetilformamida. Os autores verificaram que as diferentes cloroacetamidas estudadas apresentaram um único pico voltamétrico em aproximadamente $-2,0$ V vs. ECS. Segundo os autores, a redução das haloacetamidas ocorre via ruptura da ligação C-X, originando o respectivo carbânion e o haleto correspondente. Segundo os autores, após a ruptura da ligação C-X o carbânion eletrogerado é protonado pela própria haloacetamida inicial. A haloacetamida desprotonada pode, então, sofrer reações de ciclização ou dimerização conduzindo a uma complexa seqüência reacional, conforme apresentado no Esquema 9.



Esquema 9 - Seqüência reacional para a redução eletroquímica de haloacetamidas [45].

Neste trabalho, os principais produtos de eletrólise identificados foram os correspondes derivados das haloacetamidas cujos grupos CH_2X foram reduzidos a metila, além de compostos diméricos derivados das haloacetamidas desprotonadas. A seqüência reacional proposta pelos autores explica adequadamente os produtos formados e o fato das

eletrólises mostrarem que apenas um elétron é transferido por molécula da haloacetamida, o que é uma consequência do consumo da haloacetamida inicial pelo carbânion eletrogerado.

Um estudo mais recente sobre a redução eletroquímica de diferentes cloroacetamidas sobre carbono vítreo em meio de dimetilformamida foi realizado por Costentin et al. [46]. Neste trabalho, foi estudada a redução de cloroacetamidas e policloroacetamidas primárias e N,N-dissubstituídas. Estes autores observaram que o número de picos voltamétricos obtidos para cada cloroacetamida é igual ao número de átomos de cloro presentes na molécula original, sendo cada pico voltamétrico referente a um processo bieletrônico. Baseado neste resultado, os autores concluíram que a redução eletroquímica das cloroacetamidas estudadas conduz à completa descloração da molécula original em etapas sucessivas e separadas. Entretanto, neste trabalho os autores não realizaram estudos de identificação dos produtos eletrogerados.

Além da estrutura química, outro fator que pode exercer influência sobre a natureza química dos produtos da redução de compostos halogenados é o material eletródico empregado. Tem sido observado que a redução eletroquímica de alcanos mono-halogenados sobre mercúrio gera compostos dialquil-mercúrio como produtos de eletrólise. Segundo a literatura [30], a formação destes compostos mercurados ocorre via combinação de radicais alquil-mercúrio adsorvidos [$\text{RHg}^*_{(\text{ads})}$]. A formação de produtos organometálicos tem sido observada também quando a redução do alcano halogenado é realizada sobre chumbo, estanho e bismuto [30]. Isse et al. [47] estudaram a redução eletroquímica de diferentes haletos aromáticos sobre um eletrodo de prata em meio de acetonitrila. Neste trabalho, os autores não verificaram a formação de compostos organometálicos. Foi observado que o eletrodo de prata apresenta um pronunciado efeito catalítico para a redução eletroquímica dos haletos aromáticos. Verificou-se que, sobre o eletrodo de prata, a redução dos haletos aromáticos estudados sofre um acentuado deslocamento para potenciais mais positivos em relação ao observado sobre carbono vítreo. Os autores atribuíram este efeito catalítico a processos adsorptivos envolvendo tanto o material de partida quanto os íons haleto eletrogerados. Apesar deste elevado efeito catalítico, o eletrodo de prata não exerceu influência significativa sobre a natureza dos produtos eletrogerados, sendo identificados como produtos de eletrólise espécies diméricas e derivados desalogenados dos haletos aromáticos estudados, os quais são também formados sobre carbono vítreo.

Sobre eletrodos de carbono não há possibilidade de formação de compostos organometálicos, o que torna este material eletródico muito interessante para o estudo da redução eletroquímica de compostos halogenados, permitindo a observação direta da quebra redutiva de ligações C-X, sem contribuições de processos adsorptivos envolvendo intermediários eletrogerados. Sanecki e Skital [48] realizaram estudos cinéticos da redução eletroquímica de uma série de iodo alcanos e poli-iodo alcanos em DMF. Previamente ao desenvolvimento e aplicação dos modelos cinéticos, os autores realizaram um estudo comparativo entre a redução dos compostos halogenados sobre mercúrio e sobre carbono vítreo. Os autores verificaram que os picos voltamétricos relativos aos diferentes iodo alcanos sobre mercúrio apresentaram-se alargados e complicados pela presença de pré e pós-picos, dificultando a utilização destes voltamogramas para a obtenção de parâmetros cinéticos. Os autores atribuíram as distorções observadas nos voltamogramas à adsorção de intermediários radicalares, formando compostos de alquil mercúrio. Sobre carbono vítreo, os perfis voltamétricos obtidos foram acentuadamente melhores, o que permitiu a utilização deste material eletródico para o desenvolvimento dos estudos cinéticos. Neste trabalho, os autores verificaram que a redução dos diferentes iodo alcanos ocorre via um mecanismo seqüencial, sendo observado que o número de picos voltamétricos é sempre igual ao número de átomos de iodo presente na molécula estudada. Para uma série de mono-iodo alcanos, os autores verificaram que as constantes cinéticas das etapas eletroquímicas não sofrem variações significativas com o tamanho da cadeia do iodo alcano. Por outro lado, foi observado que a constante cinética para a dimerização do radical eletrogerado diminuiu à medida que o tamanho da cadeia do iodo alcano é aumentada.

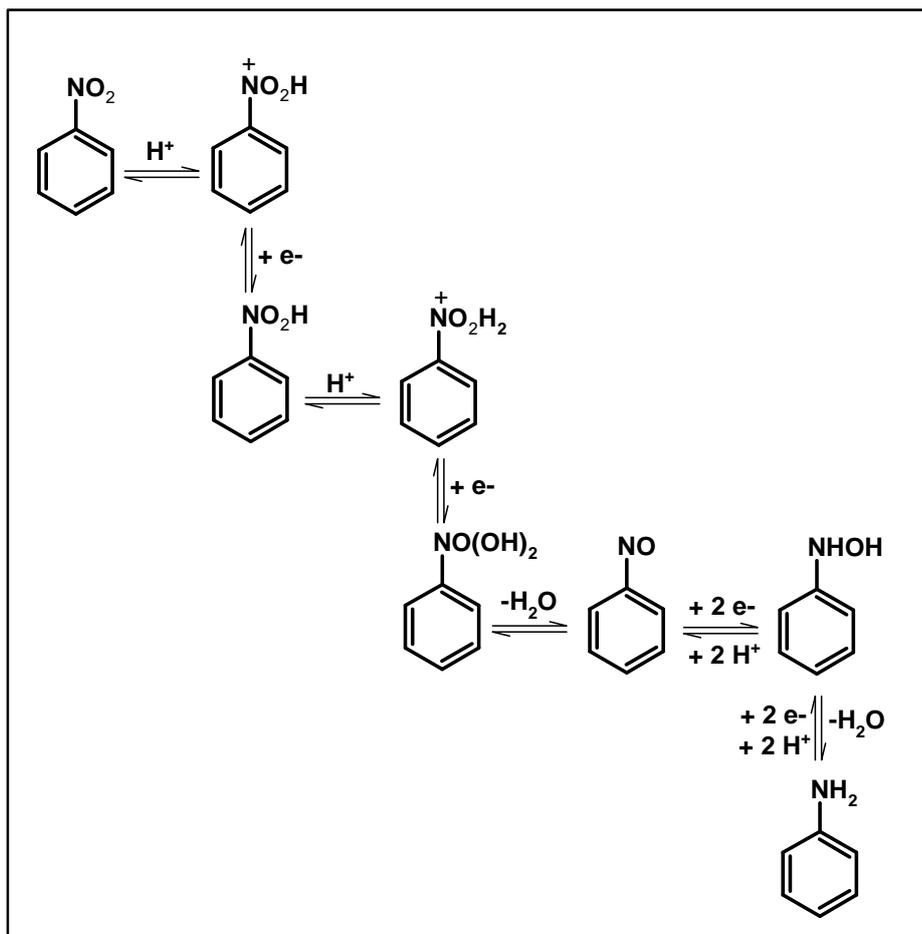
Assim, os trabalhos citados anteriormente, evidenciam que a estrutura do composto halogenado governa a natureza química dos produtos de sua redução eletroquímica. Além disso, o meio reacional também exerce influência significativa sobre os produtos eletrogerados, como consequência direta da elevada reatividade do radical e do carbânion eletrogerados. O material eletródico é outro fator que pode influenciar a natureza química dos produtos de redução de compostos halogenados, principalmente considerando eletrodos metálicos, os quais podem estabilizar intermediários radicalares, permitindo a formação de compostos organometálicos. Desta forma, estes fatores podem conduzir a diferentes números de elétrons transferidos por molécula do composto halogenado, bem como a diferentes números de picos voltamétricos observados. Para as haloacetamidas [45,46] e iodo-alcanos

[48], tem sido observado que o número de picos voltamétricos é igual ao número de átomos do halogênio, enquanto para as α,α' -dibromocetonas apenas um pico voltamétrico é observado [42,43]. Assim, a combinação adequada dos fatores que afetam a redução de compostos halogenados pode conduzir a uma grande variedade de produtos eletrogerados, o que é proveitoso para fins eletrossintéticos. Adicionalmente, a redução eletroquímica de compostos halogenados tem contribuído substancialmente para o desenvolvimento de estudos cinéticos e mecanísticos sobre transferências eletrônicas dissociativas. Portanto, a redução eletroquímica de compostos halogenados tem despertado a atenção de inúmeros pesquisadores ao longo do tempo e até os dias atuais, culminando em um elevado número de trabalhos envolvendo este processo eletródico.

1.4b - Redução eletroquímica de compostos contendo o grupo nitro

A redução eletroquímica de compostos contendo o grupo nitro desempenhou um importante papel dentro da área de eletroquímica orgânica [49]. Tem sido observado que a redução eletroquímica de nitroalcanos fornece como principal produto a respectiva alquil-hidroxilamina, a qual é reduzida à correspondente amina somente em valores de pH próximos a 7,0. Em meio ácido, alquil-hidroxilaminas não são reduzidas a correspondente amina, sendo que, tentativas de reduzir a N-metilhidroxilamina em meio de HCl a $-1,15$ V vs. ECS, promoveram a redução de H^+ com intenso desprendimento de hidrogênio, não sendo detectada a metilamina como produto de eletrólise [49].

A redução eletroquímica de compostos nitroaromáticos tem sido extensivamente estudada na literatura, sendo o nitrobenzeno o primeiro composto orgânico para o qual um voltamograma sobre o eletrodo gotejante de mercúrio foi relatado na literatura [49]. Em meio prático, é bem estabelecido que compostos nitroaromáticos são reduzidos em uma única etapa envolvendo quatro elétrons e quatro prótons originando a respectiva hidroxilamina [50], a qual pode ser reduzida à amina em potenciais mais negativos em um processo envolvendo mais dois elétrons e dois prótons. As etapas envolvidas na redução eletroquímica do nitrobenzeno, o qual serve como uma molécula modelo para o estudo de compostos nitroaromáticos mais complexos, são apresentadas no Esquema 10.



Esquema 10 - Etapas reacionais envolvidas na redução eletroquímica do nitrobenzeno.

A seqüência reacional apresentada no Esquema 10 tem sido observada para a redução eletroquímica de nitroimidazóis [51-53] e de diversos compostos nitroaromáticos [54,55]. Alguns trabalhos têm mostrado que o grupo hidroxilamina proveniente da redução eletroquímica de compostos contendo o grupo nitro pode ser re-oxidado ao grupo nitroso. A oxidação da hidroxilamina ao grupo nitroso é um processo reversível envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons [56-58], conforme ilustrado no Esquema 11.



Esquema 11 - Reação global da oxidação da hidroxilamina ao grupo nitroso.

O comportamento voltamétrico de compostos nitroaromáticos não é significativamente influenciado pelo material eletrodico. Tanto sobre mercúrio quanto sobre ouro, a redução

eletroquímica destes compostos origina dois picos voltamétricos relativos à redução do grupo nitro a hidroxilamina e, posteriormente, da hidroxilamina a amina. Comportamento voltamétrico similar, diferindo apenas nos valores de potencial, tem sido observado sobre carbono vítreo. Sobre platina não são observados picos voltamétricos relativos à redução eletroquímica de compostos nitroaromáticos antes do processo de redução de H^+ [49].

Em solventes apróticos, a redução de compostos nitroaromáticos envolve a transferência reversível de um elétron, gerando o respectivo ânion-radical $R-NO_2^{\bullet-}$, o qual pode ser reduzido reversivelmente em potenciais mais negativos ao correspondente diânion ($R-NO_2^-$) [49,58]. Tanto o ânion-radical quanto o diânion são estáveis em meio aprótico, desde que impurezas de caráter eletrofílico estejam ausentes no solvente utilizado. A presença de espécies eletrofílicas confere ao pico voltamétrico relativo à formação do diânion o aspecto de um pico voltamétrico associado a um processo irreversível.

1.4c - Redução eletroquímica de amidas

Segundo a literatura, o grupo carbonil de amidas é reduzido sobre cátodos de mercúrio ou de chumbo em meio extremamente ácido, fornecendo como principal produto o correspondente composto metilênico [59]. Eletrólises preparativas envolvendo a redução de amidas são geralmente realizadas empregando-se cátodos de chumbo em meio de ácido sulfúrico ou em meio etanólico contendo este ácido, nestas condições experimentais, o principal produto de redução é a correspondente amina metilênica [59]. Uma vez que o meio empregado nestas eletrólises é extremamente ácido, acredita-se que a espécie efetivamente eletroativa seja a amida protonada [59]. Em meio aprótico, há um relato da redução eletroquímica da N,N-dimetilbenzamida. Nestas condições experimentais, esta amida é reduzida em um processo envolvendo a transferência reversível de um elétron, produzindo o correspondente ânion-radical, o qual é relativamente estável em meio aprótico [59]. Não são encontrados relatos mais recentes sobre a redução específica do grupo carbonil de amidas em meio aprótico. Estudos sobre a redução eletroquímica de haloamidas em meio de dimetilformamida [45,46], mostram que o único processo eletródico envolvido na redução destes compostos é a quebra reductiva de suas ligações C-X, sugerindo que o grupo carbonil de amidas não é passível de redução em meio aprótico.

2 - Objetivos

O objetivo do presente trabalho é estudar a redução eletroquímica dos principais fármacos amebicidas da classe das dicloroacetamidas visando elucidar os processos eletródicos envolvidos. Além disso, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a quantificação destes fármacos em formulações farmacêuticas, uma vez que a literatura não apresenta qualquer trabalho propondo métodos analíticos para a determinação de algumas das dicloroacetamidas antiamebíacas estudadas neste trabalho.

3 - Procedimento Experimental

3.1 - Reagentes e soluções

Furoato de diloxanida (M.M. = 328,2 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, 99,9 %) foi utilizado para preparar todas as soluções estoque deste fármaco. O teclozan (M.M. = 502,3 g mol⁻¹) e a etofamida (M.M. = 427,3 g mol⁻¹) utilizados no preparo de soluções estoque destes fármacos foram gentilmente cedidos pelas indústrias farmacêuticas Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda e Pfizer do Brasil, respectivamente.

Os estudos eletroquímicos em meio aprótico foram realizados em acetonitrila (ACN) grau HPLC (J. T. Baker), a qual foi mantida em frasco âmbar contendo peneiras moleculares de 4 Å (Aldrich) para remoção de água. Como eletrólito de suporte foi utilizado tetrafluorborato de tetrabutilamônio (TBABF₄, ACROS) ou brometo de tetraetilamônio (TEABr, Merck), ambos em concentração de 0,1 mol L⁻¹. O TEABr utilizado possuía grau analítico e foi utilizado como recebido, sendo mantido em estufa a 80° C por pelo menos 24 h antes de sua utilização, visando a eliminação de água. Foram realizados experimentos eletroquímicos em ACN na presença de uma espécie doadora de prótons, sendo utilizado como doador de prótons ácido acético glacial (Merck) ou 1,1,1,3,3,3-hexaflúor-2-propanol (HFP, Aldrich).

Para a etofamida foram realizados também estudos eletroquímicos em meio misto, sendo utilizada a mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v). O tampão B.R. foi preparado misturando-se ácido acético glacial (Merck), ácido bórico (Sigma) e ácido fosfórico (Merck), todos na concentração de 0,06 mol L⁻¹, de modo que, após a mistura com ACN, a concentração final de cada um dos componentes do tampão permaneceu próxima a 0,04 mol L⁻¹. Soluções de hidróxido de sódio (Merck) 2,0 mol L⁻¹ e ácido clorídrico (Merck) 2,0 mol L⁻¹ foram utilizadas para ajustar o pH aparente (pH*) da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) no valor desejado. Para o ajuste do pH* da mistura, foi empregado um pHmetro da marca HANNA Instruments modelo HI 8417 conectado a um eletrodo combinado de vidro da Corning modelo High Performance Combo, Cat. No. 476146.

Os produtos das eletrólises realizadas em ACN foram isolados por meio de uma extração líquido-líquido, utilizando diclorometano (Merck) ou acetato de etila (Merck). Sulfato de magnésio anidro (Aldrich) foi utilizado para secagem das fases orgânicas obtidas após extração líquido-líquido. Clorofórmio deuterado (Aldrich) foi utilizado para o preparo

das amostras para análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H-RMN).

3.2 - Experimentos voltamétricos

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT 30 interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9. Nestes experimentos, foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único com capacidade de 20 mL contendo três eletrodos. Como eletrodo de trabalho foi utilizado um disco de carbono vítreo com 3,0 mm de diâmetro. Como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de Pt em espiral e um eletrodo de Ag/AgCl/KCl _{saturado}, o qual será simplifiadamente representado por Ag/AgCl _{sat}, foi empregado como eletrodo de referência. Este eletrodo de referência apresenta um baixo fluxo de solução, uma vez que o contato iônico é promovido por micro-trincas promovidas pela inserção de um fio de Pt no vidro da extremidade inferior do eletrodo. Devido a este baixo fluxo de solução, este eletrodo de referência pôde ser empregado com êxito nos experimentos conduzidos em meio não aquoso.

Antes de cada experimento, um fluxo de nitrogênio foi mantido através da célula eletroquímica por cerca de 15 min para promover a remoção do oxigênio dissolvido. Um frasco lavador contendo ACN foi utilizado para permitir a saturação do nitrogênio com este solvente, minimizando, assim, perdas de ACN da célula eletroquímica por arraste pelo nitrogênio.

3.3 - Experimentos amperométricos

Experimentos amperométricos foram realizados visando o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para o teclozan baseada em sua detecção amperométrica. Estes experimentos foram realizados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, utilizando o mesmo potenciostato empregado nos estudos voltamétricos. As medidas amperométricas foram realizadas empregando como eletrodo de trabalho um eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo com 3,0 mm de diâmetro, o qual foi conectado a um gerador de rotação da Metrohm modelo 628-10. O mesmo eletrodo de referência utilizado nos experimentos voltamétricos foi empregado nos experimentos amperométricos e um fio de Pt em espiral foi empregado como

eletrodo auxiliar. Nestes experimentos foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único da Metrohm contendo 20 mL de solução. Previamente a realização destes experimentos, a solução foi desoxigenada pela passagem de nitrogênio pela célula eletroquímica. Também nestes experimentos foi utilizado um frasco lavador para minimizar perdas de ACN da célula eletroquímica.

3.4 - Eletrólises a potencial controlado

Diferentes células eletroquímicas foram empregadas para as eletrólises coulométricas e preparativas. As eletrólises visando à determinação do número de elétrons foram realizadas empregando-se o mesmo potenciostato utilizado nos estudos voltamétricos, sendo utilizada uma célula de três compartimentos com capacidade de 15 mL, sendo o compartimento catódico separado do compartimento anódico por uma placa de vidro sinterizado. O eletrodo de trabalho utilizado nestas eletrólises foi uma placa de carbono vítreo de 2 x 2 cm. Como eletrodo auxiliar foi utilizada uma rede de Pt com 2 x 2 cm e o mesmo eletrodo de Ag/AgCl_{sat} foi empregado como eletrodo de referência. Os valores de número de elétrons transferidos por mol do fármaco determinados nestas eletrólises foram expressos na seguinte forma: (média \pm desvio padrão).

As eletrólises preparativas foram realizadas empregando-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT 12 interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9. Estas eletrólises foram realizadas em uma célula eletroquímica de maior capacidade, visando à obtenção de uma maior quantidade de produtos de eletrólise para análise posterior. A Figura 3 apresenta uma representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nestas eletrólises.

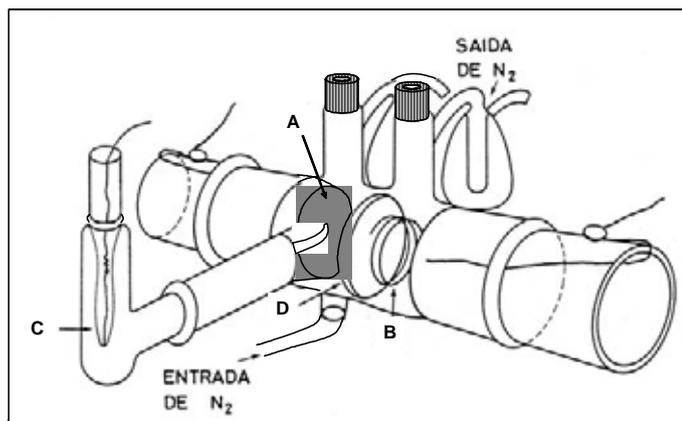


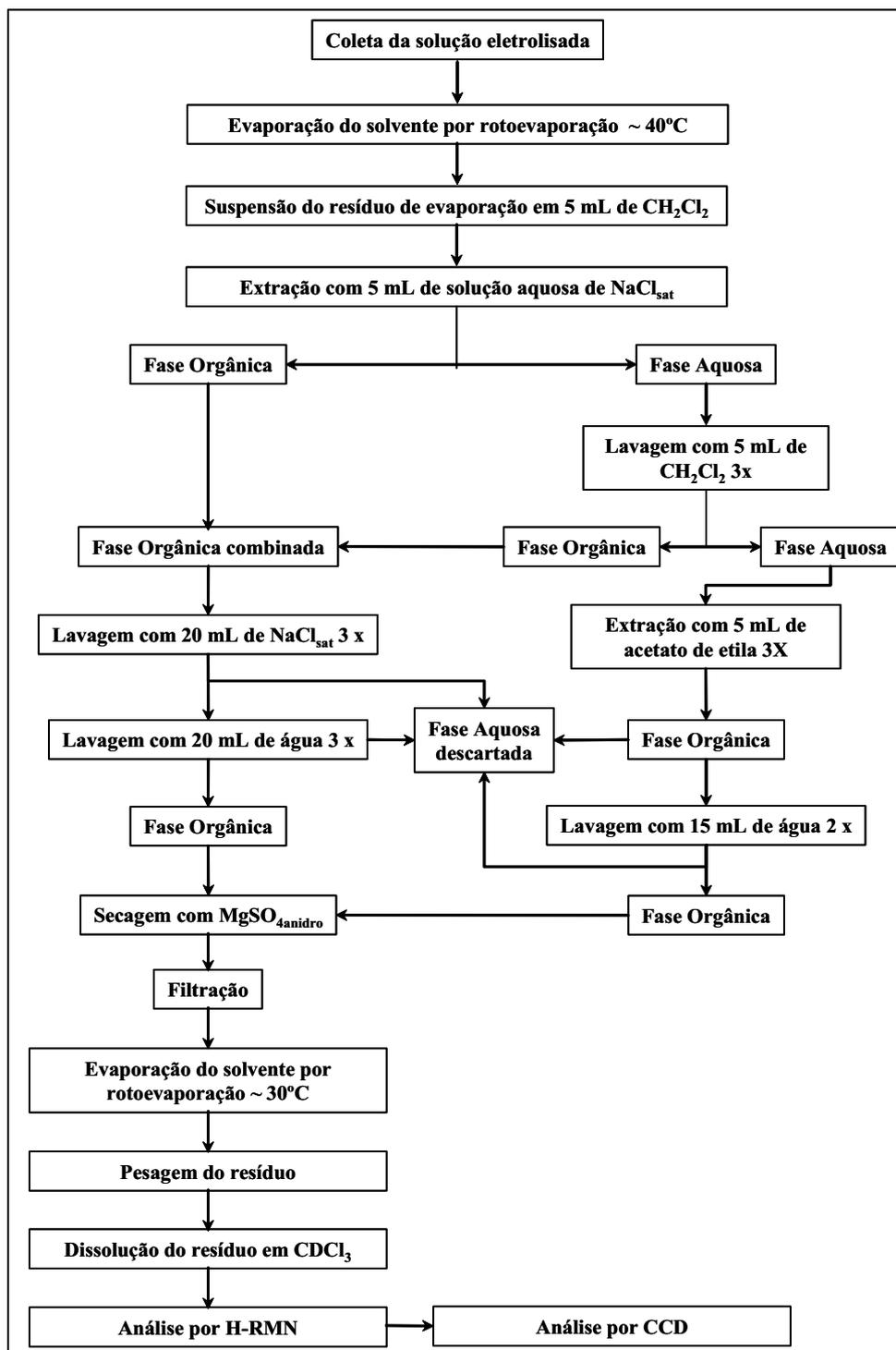
Figura 3 - Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nas eletrólises preparativas.

Conforme mostra a Figura 3, a célula utilizada nas eletrólises possui 3 compartimentos, sendo o compartimento catódico separado do compartimento anódico por uma placa de vidro sinterizado (D), ambos os compartimentos possuem capacidade de 25 mL. O eletrodo de trabalho utilizado (A) foi um disco de carbono vítreo de 2,5 cm de diâmetro. Como eletrodo auxiliar (B) foi utilizado um fio de Pt em espiral. O mesmo eletrodo de referência (C) empregado nos experimentos anteriores foi também empregado nas eletrólises preparativas.

Durante todas as eletrólises foi mantido um fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica para remover o oxigênio dissolvido e promover a agitação da solução. Nas eletrólises preparativas além da agitação promovida pelo nitrogênio, a solução do compartimento catódico foi mantida também sob agitação magnética constante, visando maximizar o transporte de massa. Em todas as eletrólises foi empregado um frasco lavador contendo ACN visando minimizar perdas deste solvente por arraste pelo nitrogênio.

3.5 - Isolamento e identificação dos produtos eletrogerados

Após cada eletrólise, os produtos eletrogerados foram isolados por meio de extração líquido-líquido, adotando o procedimento representado no Esquema 12.



Esquema 12 - Fluxograma representando o procedimento adotado na extração líquido-líquido.

Este procedimento visa promover a separação entre os produtos eletrogerados e o eletrólito de suporte, de modo que este último permaneça na fase aquosa enquanto os produtos eletrogerados permaneçam na fase orgânica. As análises por H-RMN foram realizadas

utilizando um espectrômetro Varian Unity Plus 300 MHz. As soluções obtidas após o procedimento de extração e análise por H-RMN foram analisadas também por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando placas cromatográficas com fase estacionária de sílica suportada em vidro, sendo a revelação realizada em uma câmera com lâmpada de UV.

3.6 - Desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos

Os estudos visando o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para quantificação das dicloroacetamidas foram realizados aumentando-se sistematicamente a concentração dos fármacos na célula eletroquímica por meio da adição de volumes definidos de uma solução estoque das dicloroacetamidas. Em todos os casos, para a construção das curvas analíticas foi realizada a correção de volume para que fosse levada em consideração a diluição sofrida pelo analito em virtude das sucessivas adições das soluções estoque. Os métodos eletroanalíticos foram desenvolvidos empregando-se as técnicas de voltametria de varredura linear (LSV), pulso diferencial (DPV) e onda quadrada (SWV). Para o teclozan, foi desenvolvida também uma metodologia eletroanalítica para a quantificação deste fármaco baseada em sua detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas.

Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para o teclozan e para a etofamida foram aplicados para a quantificação destes fármacos em formulações farmacêuticas comerciais empregando-se o método de adição de padrão. Os resultados das determinações dos fármacos nas formulações farmacêuticas e dos estudos de adição e recuperação foram expressos na seguinte forma: (média \pm desvio padrão).

A formulação farmacêutica contendo o teclozan como princípio ativo possui como excipientes: amido, croscarmelose sódica, polividona, talco e estearato de magnésio. Os excipientes da formulação farmacêutica contendo a etofamida como princípio ativo são: metocel, amido, celulose, estearato de magnésio e corante amarelo de tartrazina. A Figura 4 apresenta a estrutura molecular dos excipientes destas duas formulações farmacêuticas.

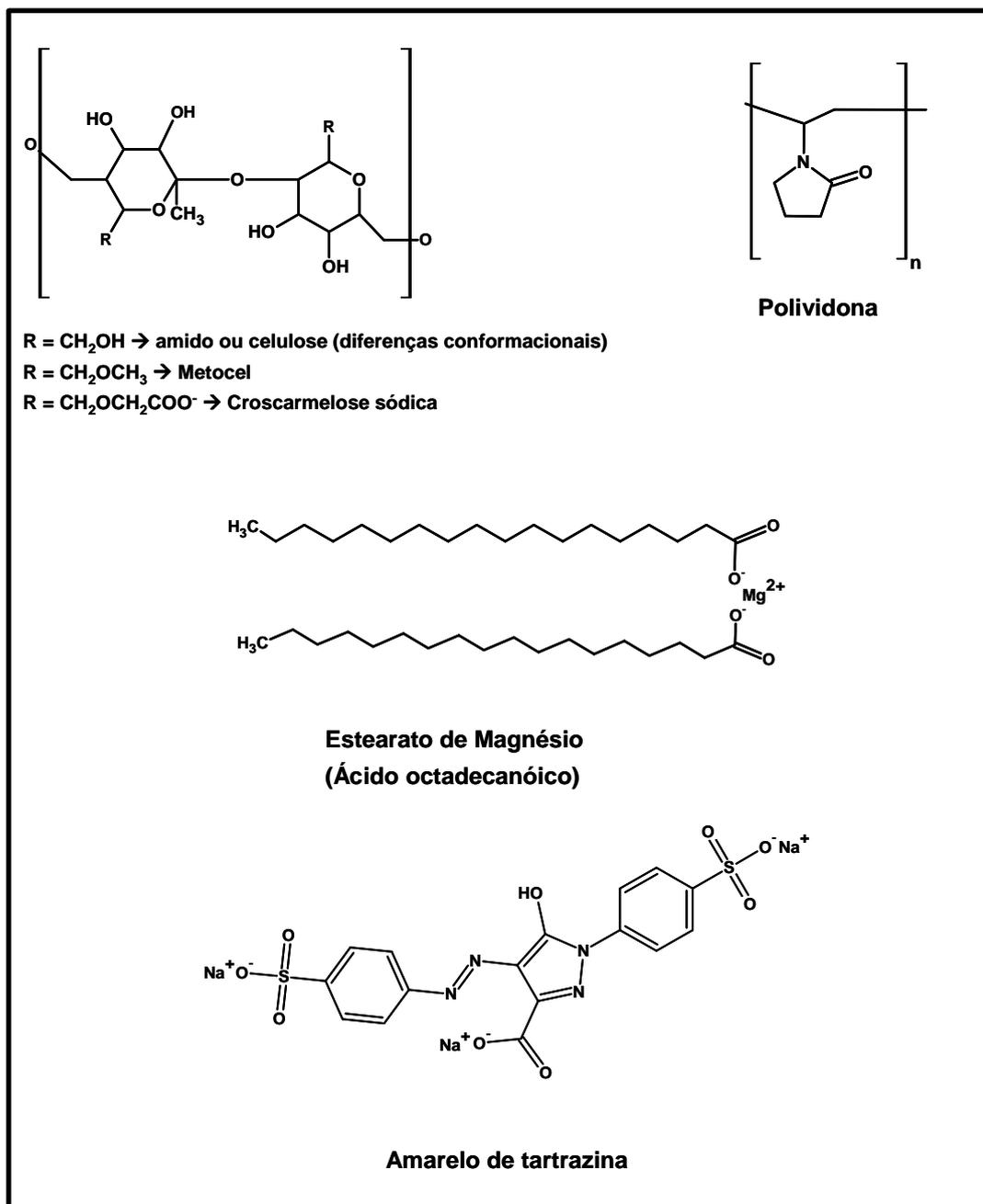


Figura 4 - Estrutura molecular dos excipientes das formulações farmacêuticas contendo as dicloroacetamidas como princípios ativos.

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Furoato de diloxanida (FD)

Previamente à realização dos estudos eletroquímicos do FD, estudou-se a solubilidade deste fármaco. Foi verificado que o FD é insolúvel em água e em soluções aquosas ácida, HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e alcalina, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se, portanto, a necessidade de se empregar um solvente orgânico para promover a completa dissolução do fármaco. O primeiro estudo envolvendo um solvente orgânico foi realizado na mistura metanol:água (KCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$), sendo verificado que a completa solubilização do fármaco é atingida somente em misturas contendo no mínimo 50 % (v/v) de metanol. Constatou-se, entretanto, que o FD não apresenta qualquer pico voltamétrico neste meio, isto devido ao limitado intervalo útil de potencial apresentado pela mistura metanol:água. Desta maneira, optou-se por realizar o estudo do comportamento eletroquímico do FD em meio totalmente orgânico, sendo utilizada ACN como solvente, a qual além de promover a completa solubilização do fármaco, apresenta um intervalo útil de potencial significativamente maior do que o apresentado pela mistura metanol:água. Assim, a menos que outro meio seja especificado, todos os experimentos eletroquímicos do FD foram realizados em ACN.

4.1a - Experimentos voltamétricos

Os estudos voltamétricos do FD sobre carbono vítreo foram realizados registrando-se voltamogramas cíclicos no intervalo de 0,0 a $-2,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, potencial no qual se observa o início do processo de descarga do solvente/eletrólito. Neste intervalo de potencial, verificou-se que o FD apresenta um único pico catódico com potencial de pico (E_p) igual a $-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ a 100 mV s^{-1} . A Figura 5 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados na ausência e na presença de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD.

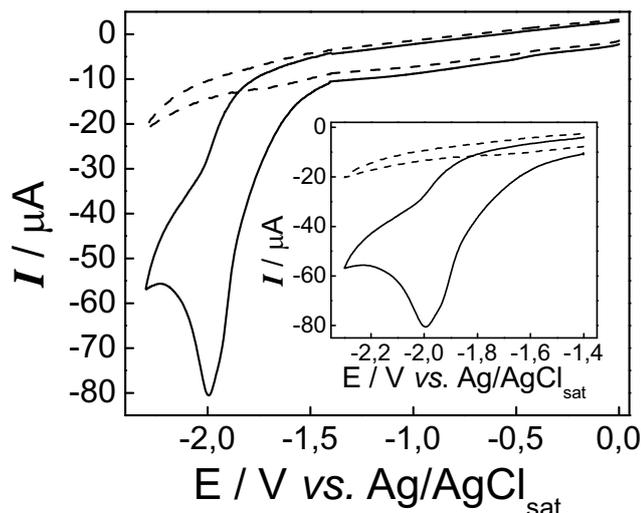


Figura 5 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (---) Ausência de FD. (—) Presença de 2,0 mmol L⁻¹ de FD. Inserido: ampliação da região entre -1,4 e -2,3 V vs. Ag/AgCl_{sat}.

A Figura 5 mostra que o voltamograma cíclico registrado em eletrólito de suporte não apresenta qualquer pico voltamétrico, indicando a ausência de impurezas eletroativas no sistema ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. Entretanto, observa-se que as correntes residuais obtidas são sempre negativas, sugerindo que estas sejam uma somatória da corrente capacitiva e de uma corrente faradaica associada a um processo catódico, o qual, provavelmente, está associado à redução de água residual.

Em presença de FD, observa-se um pico catódico, sendo constatada a ausência do correspondente pico anódico na varredura reversa. Este comportamento sugere que ou a redução eletroquímica do FD envolve uma transferência eletrônica irreversível ou que o processo eletródico é seguido por uma reação química acoplada. Verifica-se que o pico voltamétrico relativo à redução do FD é largo e aparentemente composto. O valor de E_p observado é próximo ao observado na literatura para a quebra redutiva de ligações C-Cl de cloroacetamidas [45,46]. Além disso, o perfil alargado do pico relativo à redução eletroquímica do FD é concordante com o observado para picos voltamétricos associados à quebra redutiva de ligações C-X [35,38]. Segundo a literatura [39], transferências eletrônicas seguidas por quebra de ligações, freqüentemente apresentam baixos coeficientes de transferência eletrônica (α), conseqüentemente, picos voltamétricos associados a estes processos apresentam-se muito alargados. Desta maneira, valor de E_p e o perfil do pico

voltamétrico associado à redução eletroquímica do FD sugerem que este pico seja relativo à quebra redutiva das ligações C-Cl do fármaco.

Visando obter informações adicionais sobre a redução eletroquímica do FD, foram registrados voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (v), no intervalo de 20 a 500 mV s^{-1} . A Figura 6 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em diferentes valores de v na presença de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD.

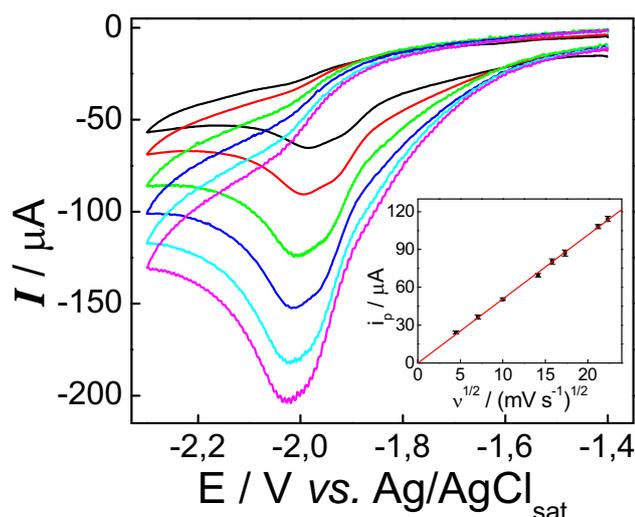


Figura 6 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBAPF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD em diferentes velocidades de varredura. (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s^{-1} . Inserido: gráfico i_p vs. $v^{1/2}$.

Conforme mostra a Figura 6, a natureza composta do pico voltamétrico relativo à redução eletroquímica do FD torna-se mais evidente nos voltamogramas cíclicos registrados em menores velocidades de varredura. Jaworski et al. [38] também observaram um pico voltamétrico de natureza composta associado à redução eletroquímica de um composto contendo dois átomos de cloro (RHCl_2). Segundo estes autores, o perfil voltamétrico obtido é uma consequência da quebra seqüencial das duas ligações C-Cl. Os autores observaram, entretanto, que o pico voltamétrico obtido corresponde a um processo eletródico envolvendo a transferência de apenas dois elétrons e não quatro como seria esperado para a quebra redutiva de duas ligações C-Cl (Esquema 1). Os autores atribuíram este resultado a reações de hidrogenação dos radicais eletrogerados promovidas pelo solvente, assim, a hidrogenação consumiria os radicais eletrogerados, evitando sua redução ao carbânion e diminuindo o número global de elétrons envolvidos no processo eletródico. Assim, a natureza composta do

pico voltamétrico relativo à redução eletroquímica do FD sugere que as duas ligações C-Cl sofrem quebra redutiva em etapas sucessivas, porém, ambas ocorrem em potenciais muito próximos.

A partir dos valores de corrente de pico (i_p) obtidos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 6, foi construído um gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$. Este gráfico apresentou um comportamento linear segundo a equação i_p (μA) = 4,9 $v^{1/2}$ [(mV s⁻¹)^{1/2}], com coeficiente de correlação linear igual a 0,9996, indicando que a redução eletroquímica do FD é um processo controlado por difusão. A Tabela 1 apresenta alguns parâmetros voltamétricos determinados em diferentes valores de v .

Tabela 1 - Parâmetros voltamétricos obtidos para a redução eletroquímica de 2,0 mmol L⁻¹ de FD em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

v / mV s ⁻¹	i_p / μA	$-E_p$ / V	$i_p/v^{1/2}$ / $\mu\text{A mV}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$
20	24	1,96	5,4
50	36	1,97	5,1
100	50	1,98	5,0
200	69	1,99	4,9
250	76	2,00	4,8
300	83	2,00	4,8
450	101	2,00	4,8
500	109	2,02	4,9

A Tabela 1 mostra uma dependência da função corrente ($i_p/v^{1/2}$) com v , o que indica a ocorrência de reações químicas acopladas à etapa de transferência eletrônica. Segundo a literatura [60], a presença de reações químicas acopladas causa ligeiras variações da função corrente com o aumento da velocidade de varredura, geralmente observa-se uma variação de 5,0 % para um aumento de dez vezes em v . Para o caso de uma transferência eletrônica reversível seguida por uma reação química irreversível (E_rC_i), espera-se um ligeiro decréscimo da função corrente para valores de v entre aproximadamente 0,05 e 5,0 V s⁻¹ [60]. Em valores de v menores do que 0,05 V s⁻¹ e maiores do que 5,0 V s⁻¹ a função corrente torna-se independente de v . Isto porque em baixas velocidades de varredura o sistema se aproxima de um sistema totalmente irreversível; e para altas velocidades de varredura o sistema se

aproxima de um sistema reversível, sendo que para ambos a função corrente não sofre variações com v [60]. Assim, a variação da função corrente com v sugere que a ausência do pico anódico na varredura reversa do voltamograma cíclico registrado em presença de FD possa ser atribuída a uma reação química acoplada e não a uma transferência eletrônica totalmente irreversível.

De acordo com a literatura [61,62], para processos eletródicos totalmente irreversíveis, as seguintes relações devem ser observadas:

$$E_p = E^{0'} + \frac{RT}{\alpha n_c F} \ln k^0 - \frac{RT}{\alpha n_c F} \left[0,78 + \ln \left(\frac{D \alpha n_c F}{RT} \right)^{1/2} \right] - \frac{RT}{2 \alpha n_c F} \ln \nu \quad (1)$$

$$E_p = E^{0'} - \frac{RT}{\alpha n_c F} \ln \left[4,4 \frac{nFAC}{k^0} \right] - \frac{RT}{\alpha n_c F} \ln i_p \quad (2)$$

Onde k^0 é a constante de velocidade de transferência eletrônica padrão ($E = E^0$) e $E^{0'}$ denota o potencial formal para o processo eletródico, os demais termos têm seus significados usuais. Além de servir como critério de diagnóstico da irreversibilidade de um processo eletródico, as equações 1 e 2 permitem a obtenção do parâmetro cinético αn_c a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de E_p vs. $\ln \nu$ e E_p vs. $\ln i_p$ (em diferentes valores de ν). O intercepto destes gráficos permite a obtenção de k^0 , desde que $E^{0'}$ para o processo em estudo seja conhecido.

Estas relações lineares não foram observadas para o FD, indicando que o pico voltamétrico associado à sua redução não está relacionado a uma simples transferência eletrônica irreversível. O comportamento não linear dos gráficos de E_p vs. $\ln \nu$ e E_p vs. $\ln i_p$ é também indicativo da presença de reações químicas acopladas a etapa de transferência eletrônica. Assim, a análise dos parâmetros voltamétricos sugere que a redução eletroquímica do FD envolva uma etapa do tipo $E_r C_i$.

A reversibilidade da transferência eletrônica relativa à redução eletroquímica do FD foi confirmada pela técnica de voltametria de onda quadrada. Esta técnica permite a utilização de altas velocidades de varredura, tornando-a extremamente útil para a análise de reações químicas acopladas. Isto porque a forma da perturbação favorece a detecção de espécies

intermediárias com tempos de meia vida relativamente baixos, uma vez que a direção do pulso de potencial é alterada em velocidades extremamente altas, geralmente superiores a 100 Hz [63]. A Figura 7 apresenta um voltamograma de onda quadrada registrado em presença de $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD, mostrando a corrente direta, a reversa e a resultante.

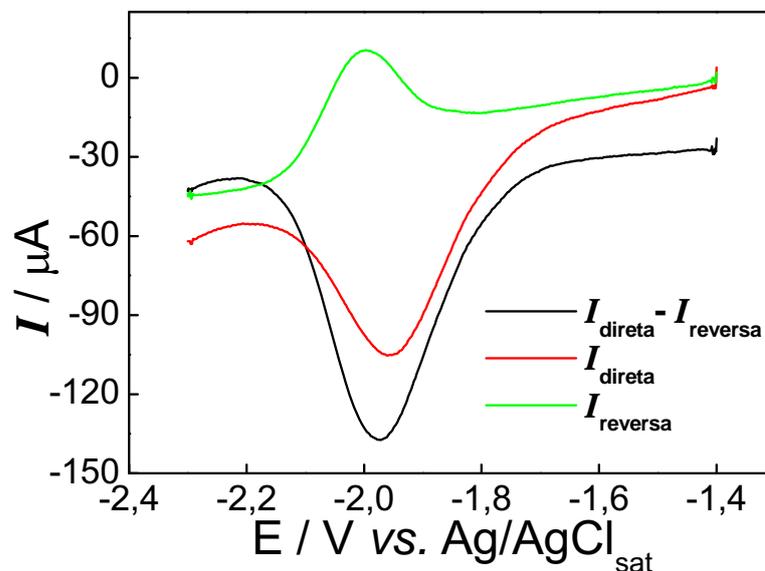


Figura 7 - Voltamograma de onda quadrada registrado em meio de ACN/TBABF_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD. Condições voltamétricas: amplitude de pulso = 100 mV, frequência = 400 Hz, incremento de potencial = 5,0 mV.

Na Figura 7, observa-se que o voltamograma reverso apresenta um pico anódico, evidenciando que a redução eletroquímica do FD envolve pelo menos uma transferência eletrônica reversível. Verificou-se que com o aumento da frequência a razão $I_{\text{direta}}/I_{\text{reversa}}$ se aproxima de um, conforme ilustrado pela Figura 8.

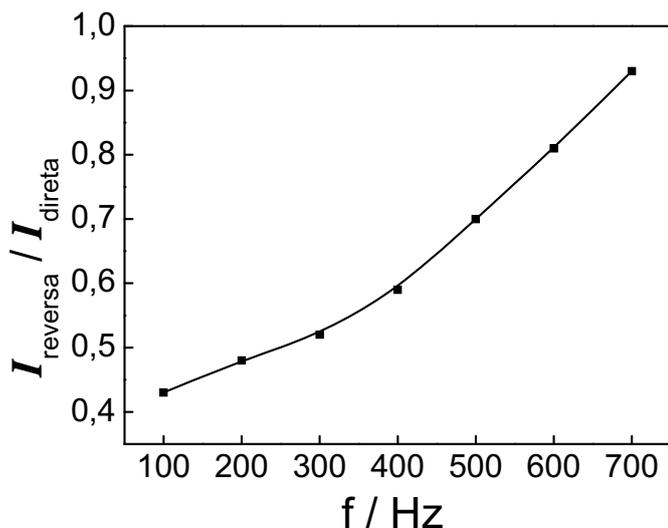


Figura 8 - Variação da razão $I_{\text{direta}}/I_{\text{reversa}}$ em função da frequência obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada registrados em presença de $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD em ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O fato da razão $I_{\text{direta}}/I_{\text{reversa}}$ ser dependente da frequência confirma que uma etapa do tipo E_rC_i está presente no mecanismo de redução eletroquímica do FD. Assim, o aumento da frequência aumenta a velocidade de varredura diminuindo o tempo disponível para que a reação química ocorra, conseqüentemente, haverá um menor consumo do produto eletrogerado o qual estará disponível para se re-oxidar, gerando o pico anódico reverso. Na frequência de 700 Hz a razão $I_{\text{direta}}/I_{\text{reversa}}$ é praticamente 1,0, indicando que nesta frequência o processo eletródico praticamente não sofre influência da reação química acoplada, conseqüentemente a mesma quantidade de produto formado pela redução do FD é re-oxidado, conduzindo a uma razão $I_{\text{direta}}/I_{\text{reversa}}$ igual a 1,0.

A reversibilidade da transferência eletrônica relativa à redução eletroquímica do FD aponta para a quebra de ligação C-Cl segundo um mecanismo seqüencial (Esquema 1), uma vez que para uma transferência eletrônica conjunta com a quebra da ligação não deveria ser observada qualquer reversibilidade. Assim, o ânion-radical eletrogerado durante a redução do FD apresenta um tempo de meia vida suficiente para que seja detectado por voltametria de onda quadrada.

Avaliou-se também o comportamento voltamétrico do FD frente a sucessivas varreduras de potencial, sendo os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo apresentados na Figura 9.

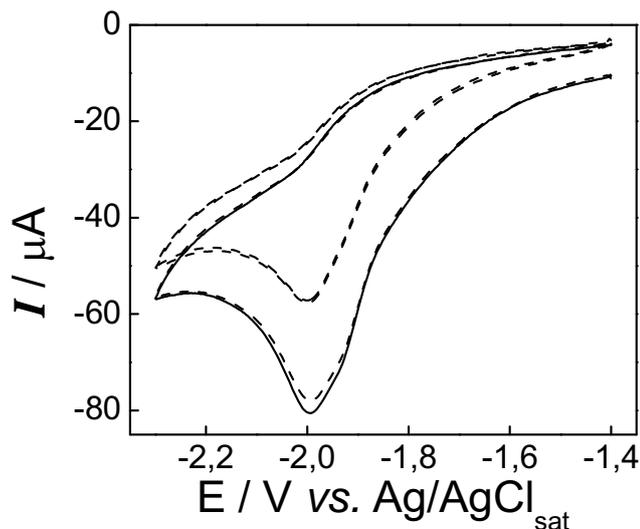


Figura 9 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 2,0 mmol L⁻¹ de FD. (---) Ciclos sucessivos. (—) Ciclo registrado após 30 s com fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica.

Conforme se observa na Figura 9, ocorre uma queda acentuada dos valores de corrente do primeiro para o segundo ciclo, a partir deste ciclo os valores de corrente se estabilizam, sendo observada uma sobreposição quase perfeita do segundo com o terceiro ciclo. A queda acentuada dos valores de corrente observada do primeiro para o segundo ciclo indica que existem dificuldades para que a concentração interfacial do FD seja restabelecida entre as varreduras sucessivas. Este comportamento sugere que o fármaco apresente um baixo coeficiente de difusão, o que limita o transporte de massa para a superfície do eletrodo. A partir do segundo ciclo, verifica-se uma estabilização dos valores de corrente, como uma consequência do equilíbrio entre o consumo do FD na região interfacial e a reposição do fármaco nesta região por transporte de massa. Na Figura 9, observa-se ainda, que o voltamograma cíclico registrado após um tempo de espera de 30 s com fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica se sobrepõe quase perfeitamente ao primeiro ciclo registrado. Este comportamento mostra que a concentração do FD na interface eletrodo/solução é restabelecida após 30 s com agitação promovida pelo fluxo de nitrogênio, indicando que durante a redução eletroquímica do FD não são formadas espécies adsorvidas na superfície do eletrodo, as quais poderiam acarretar na passivação da superfície eletródica.

4.1b - Eletrólises a potencial controlado

As eletrólises a potencial controlado foram realizadas em triplicata, sendo eletrolisados 15 mL de uma solução $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD aplicando-se $-2,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. Estas eletrólises foram realizadas em uma célula de três compartimentos com capacidade de 15 mL, sendo o compartimento catódico separado do compartimento anódico por uma placa de vidro sinterizado. O eletrodo de trabalho utilizado nestas eletrólises foi uma placa de carbono vítreo de $2 \times 2 \text{ cm}$. Como eletrodo auxiliar foi utilizada uma rede de Pt com $2 \times 2 \text{ cm}$ e um eletrodo de $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ foi empregado como eletrodo de referência. As curvas amperométricas relativas a estas eletrólises são apresentadas na Figura 10.

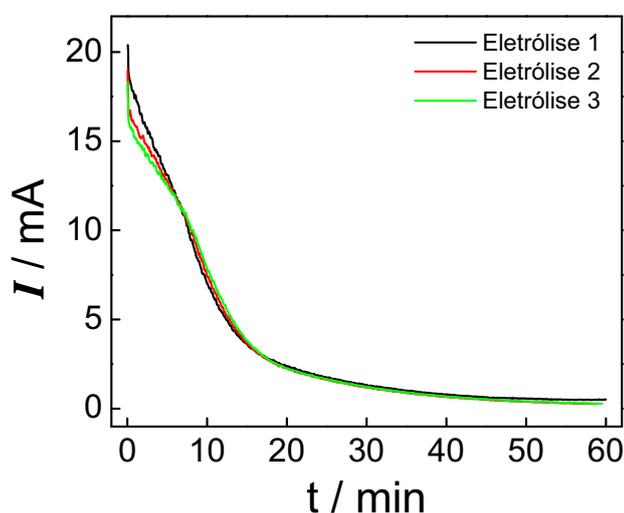


Figura 10 - Curvas amperométricas obtidas para as eletrólises de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD em meio de ACN/TBABF_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $E = -2,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com $2 \times 2 \text{ cm}$.

A Figura 10 mostra que a repetitividade das curvas amperométricas relativas às eletrólises do FD foi bastante adequada. Observa-se também que a configuração experimental empregada é eficiente, permitindo a realização das eletrólises em aproximadamente uma hora.

A integração das curvas amperométricas forneceu um valor médio de carga de $13,8 \text{ C}$. Visando descontar a carga residual, foi realizada uma eletrólise nas mesmas condições experimentais, porém na ausência do fármaco. Esta eletrólise forneceu uma carga de $1,5 \text{ C}$, a qual foi subtraída da carga obtida nas eletrólises realizadas em presença de FD. Seguindo este procedimento, as eletrólises em presença de FD forneceram um valor médio de carga de

$12,3 \pm 0,3$ C. O número de mols de FD eletrolisado foi igual a $3,0 \times 10^{-5}$ mol (15 mL de uma solução $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FD). Utilizando a lei de Faraday, pôde-se determinar que a carga média obtida nas eletrólises do FD corresponde a um número de elétrons transferidos por mol de fármaco igual a $4,2 \pm 0,1$. Este número de elétrons é coerente com a quebra das duas ligações C-Cl da molécula do FD, segundo o mecanismo clássico envolvendo dois elétrons por ligação C-Cl (Esquema 1).

Visando verificar se todo o fármaco foi efetivamente consumido durante as eletrólises, foram registrados voltamogramas cíclicos antes e após a realização das eletrólises, os quais são apresentados na Figura 11.

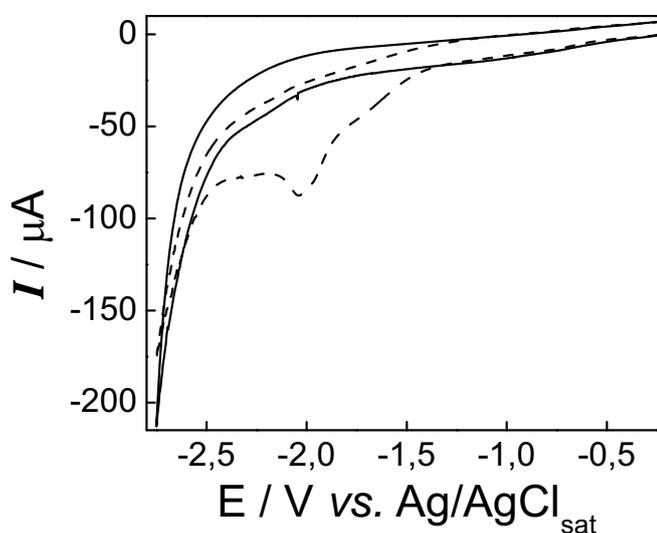


Figura 11 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

A Figura 11 mostra que após a eletrólise todo o fármaco foi consumido. No voltamograma cíclico registrado após as eletrólises verifica-se a ausência de qualquer pico voltamétrico em potenciais mais negativos do que o pico relativo ao FD. Este resultado sugere que os produtos de eletrólise não apresentam em suas estruturas ligações C-Cl passíveis de redução no intervalo útil de potencial apresentado pelo sistema ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Visando verificar se durante a redução eletroquímica do FD realmente ocorre a quebra redutiva das ligações C-Cl com conseqüente liberação do íon cloreto, foi realizado o seguinte experimento: alíquotas de uma solução de cloreto de tetrabutilamônio (TBACl) foram sucessivamente adicionadas à solução recém-eletrolisada, sendo registrados os respectivos

voltamogramas cíclicos. Previamente às adições de TBACl na solução eletrolisada, foram registrados voltamogramas cíclicos em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ na presença de diferentes concentrações de TBACl, estes voltamogramas cíclicos são apresentados na Figura 12.

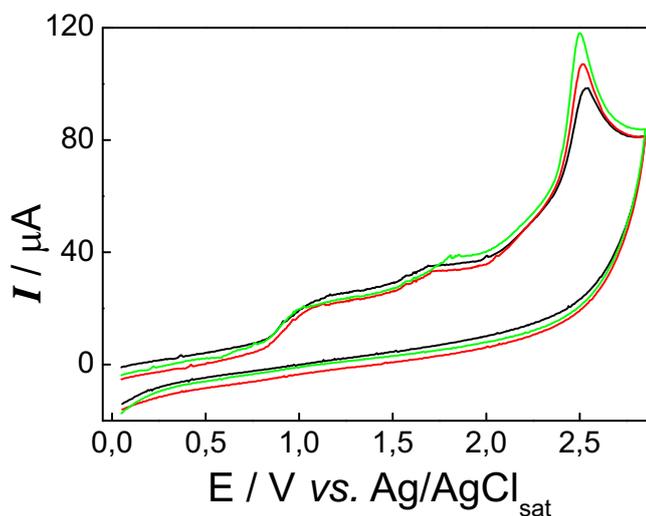


Figura 12 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de diferentes concentrações de TBACl. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,5 mmol L⁻¹; (—) 1,0 mmol L⁻¹; (—) 1,5 mmol L⁻¹.

A Figura 12 mostra que a presença de TBACl origina um pico anódico com $E_p = +2,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de TBACl. Este pico anódico pode ser atribuído à oxidação do cloreto, pois o cátion do TBACl é o mesmo que o do eletrólito de suporte, ou seja, a única espécie efetivamente adicionada ao sistema por meio da adição de TBACl é o íon cloreto. Assim, verificou-se que a oxidação deste íon origina um pico voltamétrico bem definido, o qual pode ser utilizado para quantificar o cloreto formado durante as eletrólises.

As adições de TBACl foram utilizadas para a quantificação do cloreto gerado durante as eletrólises do FD. A Figura 13 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados no intervalo de 0,0 até +2,9 V vs. Ag/AgCl_{sat} para a solução de FD antes da eletrólise, após a eletrólise e após a eletrólise com a adição de TBACl.

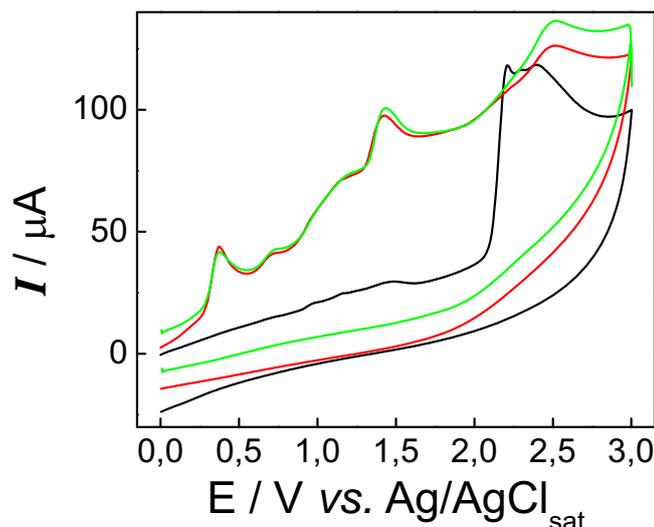


Figura 13 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/ TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Antes da eletrólise; $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise. (—) Após a eletrólise com a adição de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBACl.

A Figura 13 mostra que o voltamograma cíclico registrado antes da eletrólise apresenta um pico anódico relativo à oxidação do FD. O voltamograma cíclico registrado após a eletrólise apresenta uma série de picos anódicos os quais provavelmente são referentes à oxidação dos produtos eletrogerados durante a eletrólise do FD. Verifica-se que a adição de TBACl promove o aumento do pico voltamétrico com $E_p = + 2,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, indicando que este pico é relativo à oxidação do cloreto. Sucessivas adições de TBACl foram realizadas de modo a se obter uma curva de adição de padrão. Verificou-se uma relação linear entre i_p do pico voltamétrico em $+2,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ com a concentração de cloreto segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 17,2 + 1,3 \times 10^4 C_{\text{Cl}^-} (\text{mol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,996. A partir desta equação, foi possível determinar a concentração de cloreto eletrogerado, cujo valor médio das três eletrólises foi igual a $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$, correspondendo a $66,0 \pm 5,0 \%$ da concentração inicial do fármaco. Desta forma, verifica-se que a porcentagem de cloreto determinada é menor do que a esperada. Considerando a quebra das duas ligações C-Cl do FD a concentração de cloreto encontrada deveria ser o dobro da concentração inicial do fármaco, pois cada molécula do FD liberaria dois íons cloreto. A baixa concentração de cloreto encontrada sugere que está ocorrendo perda deste íon, uma possibilidade seria a migração do íon cloreto para o compartimento anódico. A solução deste compartimento foi analisada segundo o mesmo procedimento (sucessivas adições de TBACl), não sendo constatada a presença do íon cloreto. Provavelmente, uma vez no compartimento anódico, o íon cloreto

seria oxidado a cloro gasoso, abandonando a célula eletroquímica. A possibilidade de que o cloreto identificado seja proveniente da solução interna do eletrodo de referência foi descartada, pois nas eletrólises realizadas em ausência do fármaco (visando descontar a carga residual), o íon cloreto não foi identificado empregando as sucessivas adições de TBACl.

Assim, o número de elétrons encontrado nas eletrólises, bem como o fato do íon cloreto ter sido identificado como produto de eletrólise, indicam que a redução eletroquímica do FD envolve a quebra de suas ligações C-Cl.

4.1c - Identificação dos produtos de eletrólise do FD

Previamente a realização das eletrólises do FD visando a identificação de seus produtos de redução, foi obtido o espectro de H-RMN do padrão de FD em CDCl_3 , o qual é apresentado na Figura 14. Neste espectro, as integrações são expressas em termos do número de hidrogênios.

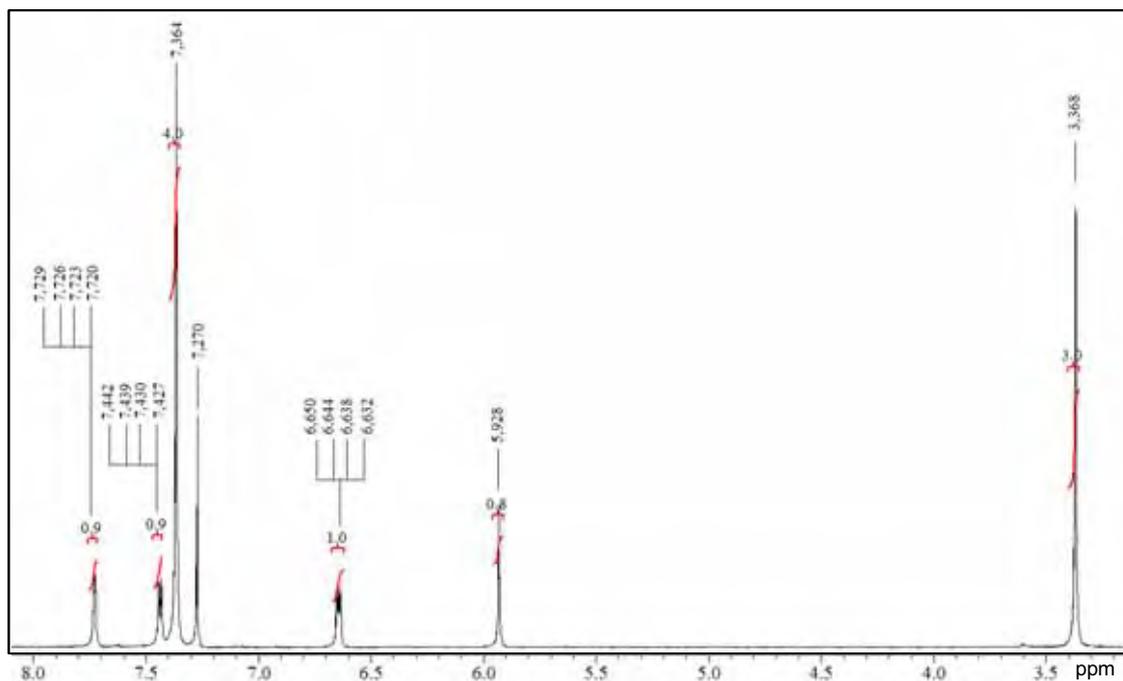


Figura 14 - Espectro de H-RMN do FD em CDCl_3 . 300 MHz. Massa de FD igual a 10 mg.

A Figura 15 apresenta a estrutura molecular do FD, explicitando alguns de seus átomos de hidrogênio.

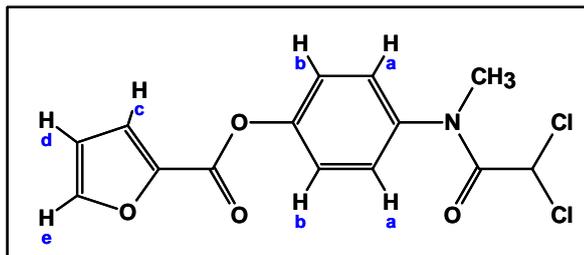


Figura 15 - Estrutura molecular do FD, explicitando alguns de seus átomos de hidrogênio.

O espectro de H-RMN apresentado na Figura 14 foi interpretado da seguinte maneira (expressando os deslocamentos químicos (δ) em ppm e referenciando os átomos de hidrogênio como indicado na Figura 15): δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 3,37 (3H, s, NCH_3); 5,93 (1H, s, CHCl_2); 6,64 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz e 1,8 Hz, H_d); 7,36 (4H, s, H_a e H_b); 7,43 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz e 0,9 Hz, H_c); 7,72 (1H, dd, $J = 1,8$ Hz e 0,9 Hz, H_e). O sinal em 7,27 ppm é relativo ao sinal residual do CDCl_3 . Uma particularidade neste espectro é que todos os hidrogênios arílicos do FD são equivalentes, isto porque os grupamentos NC=O e OC=O apresentam eletronegatividades muito próximas, conferindo aos hidrogênios H_a e H_b ambientes químicos idênticos.

Após a obtenção e interpretação dos espectros de H-RMN do padrão de FD, avaliou-se a eficiência do procedimento de extração líquido-líquido descrito na seção 3.5. Para isto, foram preparados 15 mL de uma solução 5,0 mmol L^{-1} de FD em ACN contendo 0,1 mol L^{-1} de TBABF_4 , o que corresponde a uma massa de FD igual a 25 mg. Esta solução foi, então, submetida ao procedimento de extração, sendo verificado, entretanto, que o espectro de H-RMN deste resíduo de extração apresentou os sinais relativos ao cátion do eletrólito de suporte, indicando que, nestas condições experimentais, o procedimento de extração não é eficiente. Diante deste resultado, optou-se por substituir o TBABF_4 por TEABr , cujo cátion é menor e, portanto, tem maior afinidade com a fase aquosa do que o tetrabutilamônio. Desta maneira, este experimento foi repetido utilizando o TEABr . A massa de resíduo obtida após a extração foi de 22 mg, correspondendo a um rendimento em relação à massa inicial de fármaco de 89 %. O espectro de H-RMN obtido para este resíduo foi concordante com o espectro do padrão de FD (Figura 14). Este resultado é importante e mostra que o procedimento de extração não promove nenhum tipo de degradação da molécula de FD. Além disso, neste espectro não foram encontrados sinais relativos ao cátion do eletrólito de suporte ou do diclorometano utilizado na extração, indicando que a massa de resíduo obtida

corresponde unicamente ao FD, mostrando que o procedimento de extração é adequado e eficiente, desde que o TEABr seja utilizado como eletrólito de suporte.

Em virtude de todos os experimentos eletroquímicos anteriores terem sido realizados utilizando TBABF₄, foi realizado um estudo voltamétrico do FD utilizando TEABr, visando efetuar uma comparação entre os resultados obtidos com ambos os eletrólitos de suporte. A Figura 16 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de 3,0 mmol L⁻¹ de FD utilizando ambos os eletrólitos de suporte.

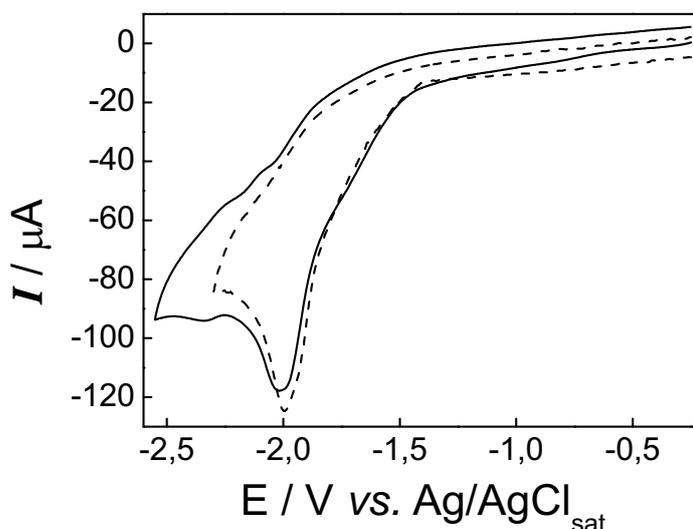


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de 3,0 mmol L⁻¹ de FD a 100 mV s⁻¹. (—) ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹. (---)ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

A Figura 16 mostra que a utilização de TEABr como eletrólito de suporte não causa alterações drásticas no perfil voltamétrico do FD em comparação ao perfil obtido em TBABF₄. Em presença de TEABr, verifica-se apenas uma ligeira diminuição no valor de i_p e um pequeno deslocamento do pico voltamétrico para potenciais mais negativos em comparação com o TBABF₄. Visando determinar se, de fato, a substituição do eletrólito de suporte não afeta o processo eletródico, foram realizados estudos em função de v em presença de 3,0 mmol L⁻¹ de FD, utilizando ambos os eletrólitos de suporte. Estes estudos foram realizados no intervalo de v compreendido entre 10 e 300 mV s⁻¹, empregando-se um disco de carbono vítreo com 3,0 mm de diâmetro como eletrodo de trabalho. Em TBABF₄ verificou-se uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: i_p (μA) = 7,3 $v^{1/2}$ [(mV s⁻¹)^{1/2}] ($n = 7$), com coeficiente de correlação linear igual a 0,9993. Para o TEABr verificou-se uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: i_p (μA) = 7,2 $v^{1/2}$ [(mV s⁻¹)^{1/2}] ($n = 7$), com coeficiente

de correlação linear igual a 0,9995. Assim, a concordância entre os coeficientes angulares dos gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ indica que o número de elétrons transferidos na redução eletroquímica do FD é o mesmo para ambos os eletrólitos de suporte, e que, portanto, a substituição do TBABF₄ por TEABr não teve influência significativa sobre o processo eletródico estudado. Assim, os produtos eletrogerados por eletrólise a potencial controlado em meio de ACN/TEABr deverão ser, essencialmente, os mesmos obtidos em ACN/TBABF₄, meio este no qual toda a caracterização voltamétrica do FD foi previamente realizada.

As eletrólises visando a identificação dos produtos da redução eletroquímica do FD foram realizadas empregando-se a célula eletroquímica representada na Figura 3, sendo eletrolisados 25 mL de uma solução contendo 20 mg de FD em ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹, o que corresponde a uma concentração do fármaco de 2,4 mmol L⁻¹. A célula eletroquímica utilizada nestas eletrólises apresenta a vantagem de comportar 25 mL no compartimento catódico, o que permite que seja utilizada uma massa relativamente alta do fármaco (20 mg) sem que este esteja em concentrações muito elevadas. Assim, a concentração molar do FD nestas novas eletrólises é próxima aos 2,0 mmol L⁻¹ utilizados na caracterização voltamétrica e nas eletrólises visando à determinação do número de elétrons envolvidos na redução eletroquímica do fármaco. As curvas amperométricas obtidas nestas eletrólises foram concordantes com as obtidas anteriormente, sendo verificado também o completo consumo do fármaco após estas novas eletrólises.

As soluções eletrolisadas foram coletadas e submetidas ao procedimento de extração, sendo o resíduo resultante da fase orgânica analisado por espectrometria de H-RMN. A Figura 17 apresenta o espectro de H-RMN obtido para uma das soluções eletrolisadas, sendo as integrais expressas em termos percentuais.

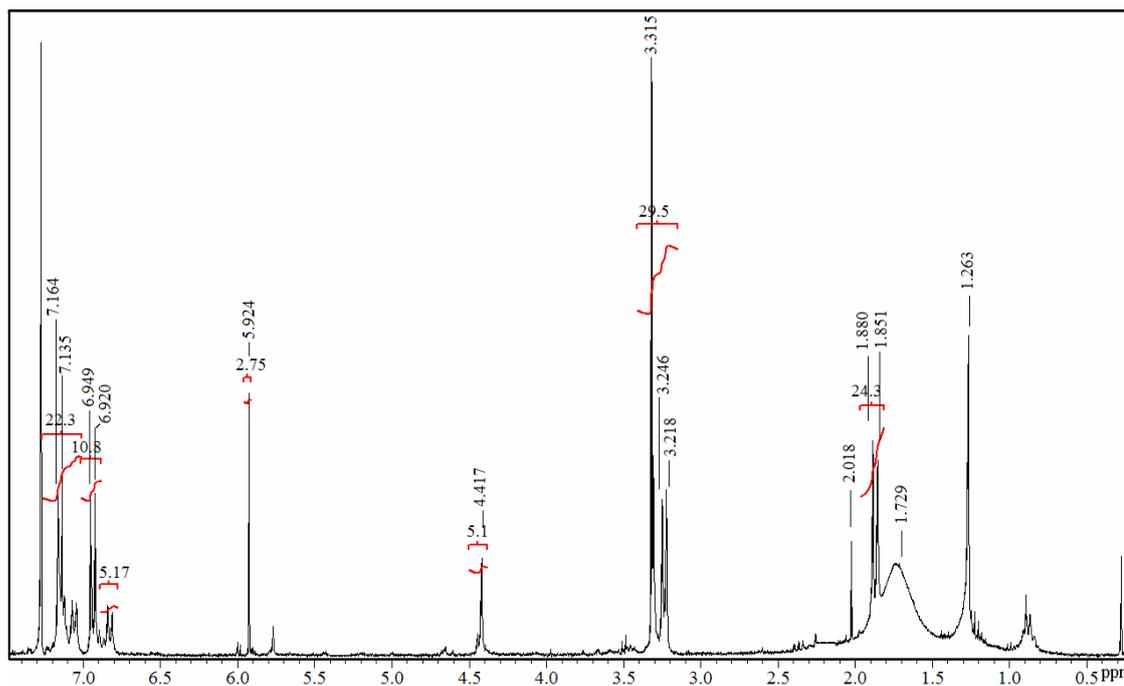


Figura 17 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica obtido após eletrólise do FD em ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹. 300 MHz, CDCl₃.

O espectro de H-RMN apresentado na Figura 17 é complexo e indica uma mistura de compostos, sendo possível verificar a presença de diferentes padrões de substituição do anel benzênico (sinais entre 6,8 e 7,5 ppm). Verifica-se também, que o grupamento CHCl₂ ainda está presente nos produtos de eletrólise (singleto em 5,9 ppm). Além disso, observa-se um singleto localizado em 4,4 ppm, o qual poderia estar associado a grupamentos CH₂Cl [64,65]. Esta observação, aliada a presença do grupamento CHCl₂, sugere que não ocorre quebra de todas as ligações C-Cl para todo o FD inicialmente presente. Porém, este resultado deve ser interpretado com cautela, pois a concentração de produtos clorados na célula de eletrólise é muito baixa, uma vez que os voltamogramas cíclicos registrados após as eletrólises não apresentaram picos voltamétricos relativos à quebra redutiva de ligações C-Cl. A massa de resíduo obtida após extração foi de apenas 5 mg, massa esta que, conforme mostra a Figura 17, é referente a uma mistura de compostos. Assim, estes resultados mostram que a concentração de produtos clorados identificados após as eletrólises do FD é muito baixa, portanto, estes produtos podem não ser representativos das principais reações envolvidas na redução eletroquímica do FD. No espectro de H-RMN apresentado na Figura 17, constata-se ausência completa dos sinais relativos ao anel furânico, indicando que durante as eletrólises ocorreu também a quebra do éster.

Apesar da complexidade do espectro apresentado na Figura 17, os sinais em 1,8 e 3,2 ppm, cujas integrações estão em razão de um para um, apresentam valores de δ muito próximos ao esperado para as duas metilas do grupamento $-\text{NCH}_3\text{COCH}_3$ [65], sugerindo que o derivado desalogenado da diloxanida seja um dos produtos da redução eletroquímica do FD. O sinal do H da hidroxila de um grupamento fenólico pode variar em um amplo intervalo de δ , ou mesmo não aparecer, em função da concentração da espécie ou da presença de água residual [64]. O espectro apresentado na Figura 17 apresenta um sinal largo entre 1,2 e 2,0 ppm, cujo perfil é característico de grupamentos $-\text{OH}$, o fato da integração deste sinal ser extremamente elevada sugere que a amostra contém água residual. Assim, existe a possibilidade da água ter promovido a desprotonação do grupamento fenólico do derivado desalogenado da diloxanida, de modo que o sinal de sua hidroxila não possa mais ser visualizado em sua posição típica ($\delta > 9,0$ ppm) [64,65].

Visando determinar o número de produtos formados durante a eletrólise do FD, as soluções eletrolisadas foram analisadas por CCD, utilizando acetato de etila como fase móvel. Verificou-se a presença de 4 manchas na placa cromatográfica com fatores de retenção (R_f) iguais a: 0,25; 0,43; 0,50 e 0,64, sendo o R_f do FD nesta mesma placa igual a 0,76. Quando a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) foi empregada como fase móvel, todos os R_f diminuíram, sendo obtidos os seguintes valores: 0,16; 0,21; 0,31 e 0,48. O R_f relativo ao FD nesta mesma placa cromatográfica foi igual a 0,57. Desta forma, os estudos por CCD mostraram que as eletrólises do FD geram uma complexa mistura de produtos contendo, pelo menos, quatro componentes. É importante notar que o FD foi totalmente consumido durante as eletrólises, uma vez que a mancha cromatográfica relativa ao fármaco não foi detectada na análise dos produtos de eletrólise por CCD.

Para as diferentes eletrólises realizadas com o FD, verificou-se que o número de manchas e os R_f obtidos por CCD, bem como os espectros de H-RMN foram concordantes entre si. Foi verificada apenas uma ligeira variação nas intensidades relativas dos sinais nos espectros de H-RMN. Este resultado mostra que, para diferentes eletrólises do FD, são geradas as mesmas espécies químicas, porém a proporção entre elas sofre variação.

Durante a realização das eletrólises do FD, verificou-se que a solução desenvolveu uma coloração amarela, a qual evoluiu até uma coloração castanho-escuro. Este desenvolvimento de cor já tinha sido observado nas eletrólises anteriores e é concordante com

alterações estruturais na molécula do FD, uma vez que soluções deste fármaco em ACN não apresentam qualquer coloração. Após a realização das extrações, verificou-se que a fase aquosa também adquiriu uma coloração levemente amarelada, indicando a presença de produtos de eletrólise nesta fase. Diante desta observação, realizou-se uma extração líquido-líquido da fase aquosa utilizando acetato de etila. Entretanto, após este procedimento, obteve-se uma massa de resíduo de apenas 3 mg e a fase aquosa continuou com a coloração amarelada, indicando que o procedimento de extração não foi eficiente. Assim, em virtude da possibilidade de se formarem espécies que possam se encontrar em sua forma desprotonada e, portanto, com carga, o que impedira sua remoção da fase aquosa, esta fase foi acidificada com HCl 1,0 mol L⁻¹, de modo que a concentração do ácido na fase aquosa fosse de 0,1 mol L⁻¹. O espectro de H-RMN do resíduo obtido após a extração da fase aquosa acidificada é apresentado na Figura 18, neste espectro as integrações são expressas em termos porcentuais.

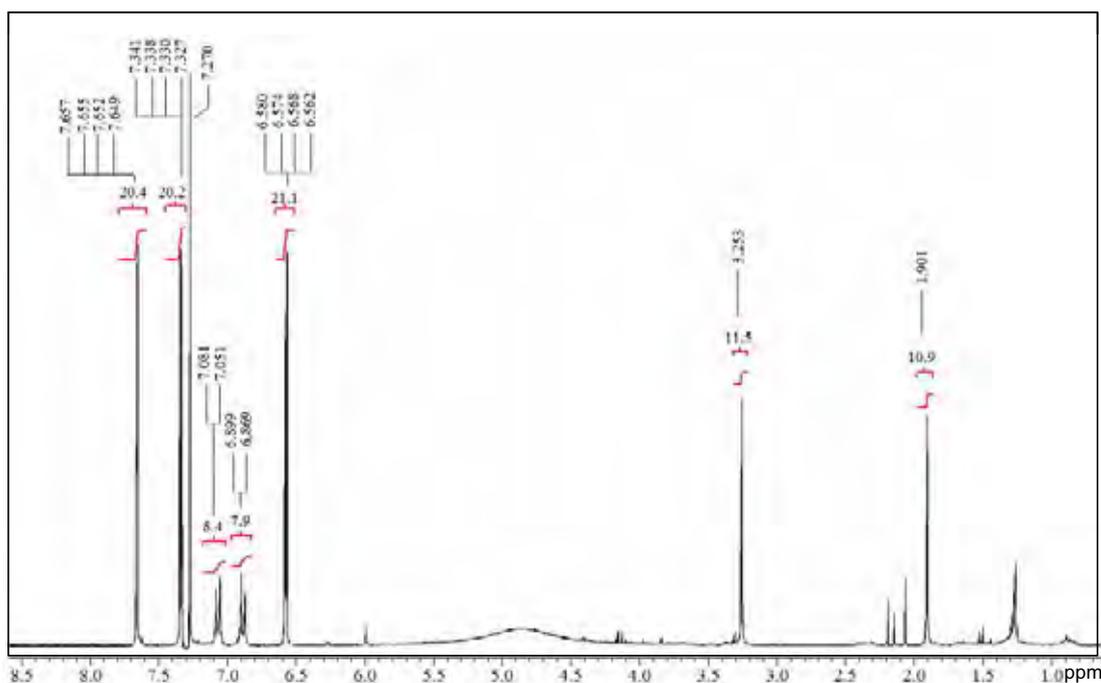
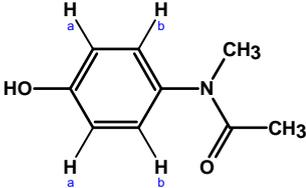
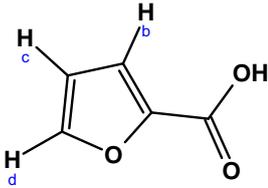


Figura 18 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase aquosa obtido após eletrólise do FD. 300 MHz em CDCl₃.

O espectro de H-RMN apresentado na Figura 18 mostra claramente os sinais referentes ao anel furânico. Observa-se também a presença de um pico largo entre 4,6 e 5,2 ppm, cuja integração é muito elevada, indicando novamente a presença de água na amostra, o que impossibilita a visualização de grupamentos -OH fenólicos em sua posição

típica. O espectro de H-RMN apresentado na Figura 18 indica uma mistura de dois componentes. A Tabela 2 apresenta a interpretação deste espectro juntamente com as respectivas estruturas químicas propostas.

Tabela 2 - Interpretação do espectro de H-RMN apresentado na Figura 18 e respectivas estruturas químicas propostas.

	Interpretação do espectro δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3)	Estrutura proposta
Composto A	1,9 (3H, s, COCH_3); 3,2 (3H, s, NCH_3); 4,6-5,2 (s largo, OH); 6,9 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H_a); 7,1 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H_b)	
Ácido furóico	6,6 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz e $1,8$ Hz, H_c); 7,3 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz e $0,9$ Hz, H_b); 7,6 (1H, dd, $J = 1,8$ Hz e $0,9$ Hz, H_d);	

A identificação do derivado desalogenado da diloxanida (composto A) tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica, confirma que a redução eletroquímica do FD envolve a quebra de suas duas ligações C-Cl. Os valores de δ , bem como as constantes de acoplamento obtidas para o ácido furóico são concordantes com valores relatados na literatura para este composto [65,66].

As análises por CCD desta amostra, utilizando acetato de etila como fase móvel, mostraram apenas duas manchas cromatográficas, com R_f iguais a 0,20 e 0,42, enquanto a utilização da mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) diminuiu os valores de R_f para 0,09 e 0,21. Devido a maior polaridade do ácido furóico, este deve interagir mais fortemente com a sílica da fase estacionária, conseqüentemente, seu R_f deve ser menor do que o do derivado desalogenado da diloxanida tanto utilizando acetato de etila quanto a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) como fase móvel. Assim, o derivado desalogenado da diloxanida é o composto responsável pelas manchas com R_f de 0,42 e 0,21 utilizando, respectivamente, acetato de etila e a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) como

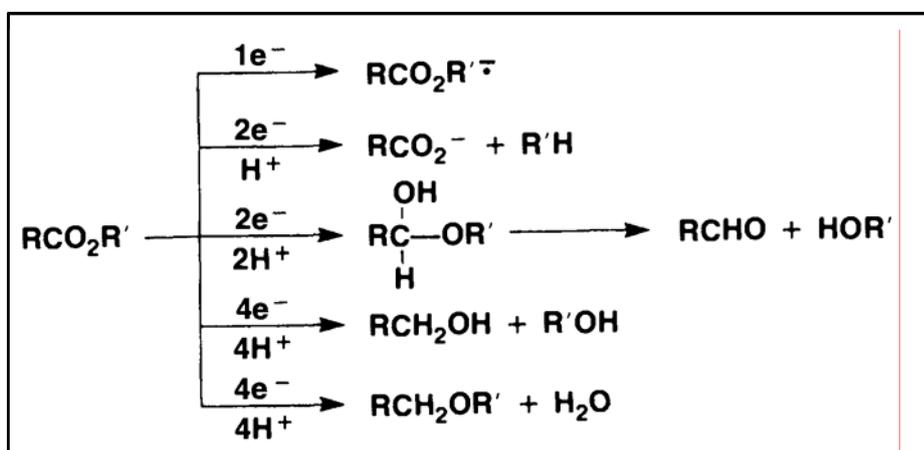
fase móvel. Uma comparação entre os valores de R_f obtidos com os resíduos da fase aquosa e da fase orgânica sugere que o derivado desalogenado da diloxanida esteja presente também na fase orgânica, conforme sugerido pelo espectro de H-RMN apresentado na Figura 17.

Assim, uma vez que os estudos por CCD também sugeriram a presença de apenas dois componentes na amostra cujo espectro é apresentado na Figura 18, pode-se estimar a proporção de cada componente da mistura a partir da relação entre a integração média por H de cada um dos compostos. O espectro apresentado na Figura 18 mostra que o ácido furóico apresenta uma integração média de 20,6 por H enquanto o derivado desalogenado da diloxanida apresenta uma integração média de 3,9 por H. A partir destes valores, constata-se que a mistura é composta por 84 % de ácido furóico e 16 % do derivado desalogenado da diloxanida. Utilizando estas proporções, e conhecendo-se a massa total do resíduo obtido, a qual foi igual a 7 mg, pode-se obter uma estimativa da massa de cada componente da amostra. Empregando este procedimento, determinou-se que, dos 7 mg do resíduo, 6 mg são de ácido furóico e 1 mg são do derivado desalogenado da diloxanida. Como a relação estequiométrica molar entre o FD e estes dois produtos é de um para um, pode-se determinar o número de mols de cada um dos dois produtos identificados e calcular diretamente sua proporção em relação ao número de mols inicial de FD. A massa molar do ácido furóico é de $112,1 \text{ g mol}^{-1}$, portanto, 6 mg deste composto correspondem a $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol}$ de ácido furóico. O número inicial de mols de FD foi de $6,0 \times 10^{-5}$, portanto, o número de mols de ácido furóico encontrado na fase aquosa corresponde a 87 % do número inicial de mols de FD. Este resultado mostra que a quebra do éster ocorre com praticamente todo o FD inicialmente presente e que praticamente todo o ácido furóico gerado permanece na fase aquosa, sendo, após acidificação desta, eficientemente extraído com acetato de etila. Para o derivado desalogenado da diloxanida, cuja massa molar é igual a $218,1 \text{ g mol}^{-1}$, 1 mg corresponde a $5,1 \times 10^{-6} \text{ mol}$, portanto, 9 % do número inicial de mols de FD. É importante ressaltar que este balanço em termos de número de mols é uma mera aproximação, uma vez que, como mostra a Figura 18, além dos dois componentes identificados, a mistura também contém água. Assim, o número de mols de cada componente encontra-se superestimado.

A baixa porcentagem do derivado desalogenado da diloxanida, a princípio, sugere que a quebra das duas ligações C-Cl ocorre apenas em pequena extensão. Porém, o número de elétrons encontrado e a porcentagem de cloreto identificada apontam para a ocorrência da quebra de ligações C-Cl em maior extensão. Os espectros relativos à fase orgânica e aquosa

mostraram que o derivado desalogenado da diloxanida está presente em ambas as fases. Assim, a polaridade deste composto faz com que ele esteja distribuído entre as fases orgânicas e aquosas, o que diminui a eficiência do procedimento de extração para este produto. Portanto, a baixa porcentagem identificada do derivado desalogenado da diloxanida não necessariamente implica que este composto seja formado em pequena quantidade durante as eletrólises.

Desta maneira, de acordo com os produtos identificados, verifica-se que durante as eletrólises do FD ocorre, além da quebra de suas ligações C-Cl, a quebra do éster. Segundo a literatura [59], a redução eletroquímica de ésteres pode ocorrer segundo uma das etapas apresentadas no Esquema 13.



Esquema 13 - Possíveis etapas reacionais da redução eletroquímica de ésteres [59].

Conforme mostram as reações apresentadas no Esquema 13, via redução eletroquímica de um éster, não seria possível a obtenção dos produtos identificados (um ácido e um álcool). Esta observação mostra que a conversão do FD aos produtos identificados é um processo complexo, envolvendo tanto etapas químicas quanto eletroquímicas, sugerindo inclusive a participação de água como fonte de grupos hidroxila. Desta forma, a água residual pode promover a hidrólise básica do éster em um processo químico, uma vez que, em condições de eletrólise, o meio torna-se básico.

Visando obter informações adicionais sobre a redução eletroquímica do FD, foram realizadas eletrólises em presença de uma espécie doadora de prótons (HFP). Porém, foi verificado que durante estas eletrólises ocorre redução de H^+ concomitantemente a redução do

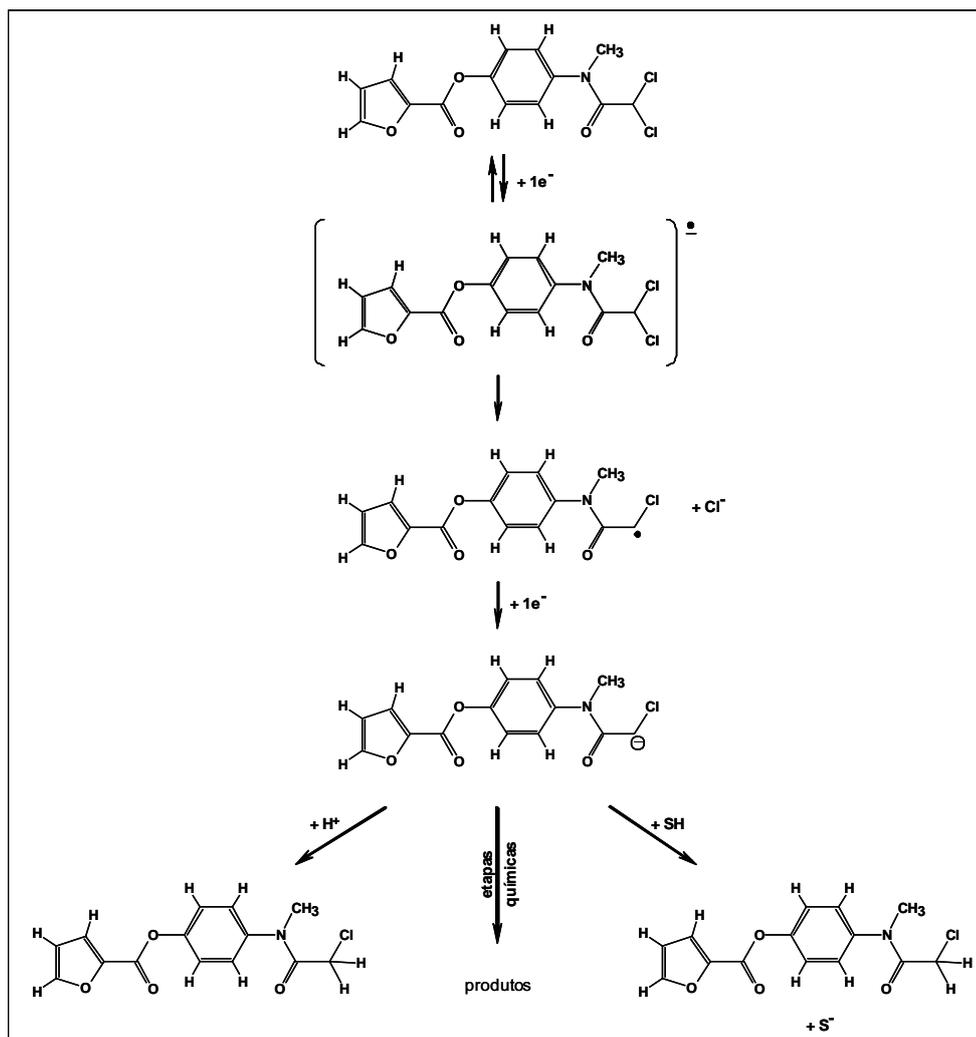
FD. Conseqüentemente, estas eletrólises forneceram elevados valores de carga. Na presença de FD foi obtida uma carga de 59,4 C enquanto as eletrólises realizadas com o doador de prótons porém na ausência de FD forneceram uma carga de 29,8 C. Assim, a carga devida unicamente a redução eletroquímica do FD seria de 29,6 C, o que corresponderia a 5,1 elétrons por mol do fármaco. Este resultado, a princípio, sugere que a redução eletroquímica do FD sofre influência de prótons, o que não é concordante com o observado na literatura para a quebra redutiva de ligações C-Cl. Entretanto, no caso de uma elevada carga residual, o procedimento de se descontar a carga de uma eletrólise realizada na ausência de FD não é muito exato, podendo comprometer a confiabilidade do número de elétrons determinado por este procedimento. Os espectros de H-RMN obtidos após estas eletrólises foram ainda mais complexos que os obtidos na ausência do doador de prótons, sendo que as análises por CCD revelaram a presença de seis manchas cromatográficas. O maior número de produtos obtido na presença do doador de prótons provavelmente está relacionado à ocorrência de reações de hidrogenação do FD e de seus produtos de redução. Apesar da maior complexidade dos espectros de H-RMN, estes mostraram a ausência dos sinais relativos aos grupamentos CHCl_2 e CH_2Cl tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa. Os estudos por CCD apresentaram a mancha cromatográfica relativa ao derivado desalogenado da diloxanida em ambas as fases.

Adicionalmente, foram realizadas eletrólises do FD em etanol e metanol, porém estas eletrólises não puderam ser empregadas para determinar o número de elétrons envolvidos na redução eletroquímica do FD, em virtude da proximidade deste processo à descarga do sistema solvente/eletrólito. Durante estas eletrólises, verificou-se também a quebra do éster, promovendo uma alcoólise do FD pelo solvente. Assim, em etanol um dos produtos de eletrólise identificado foi o furoato de etila δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 1,39 (3H, t, J 7,2 Hz, OCH_2CH_3); 4,38 (2H, q, J 7,2 Hz, OCH_2CH_3); 6,52 (1H, dd, J 3,6 e 1,8 Hz, H_c); 7,19 (1H, dd, J 3,6 e 0,9 Hz, H_b); 7,58 (1H, dd, J 1,8 e 0,9 Hz, H_d). Em metanol, um dos produtos identificados foi o furoato de metila δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 3,92 (3H, s, OCH_3); 6,52 (1H, dd, J 3,6 e 1,8 Hz, H_c); 7,2 (1H, dd, J 3,6 e 0,9 Hz, H_b); 7,58 (1H, dd, J 1,8 e 0,9 Hz, H_d), sendo, em ambos os casos, H_b , H_c e H_d designados como na Tabela 2.

Estes resultados mostram que a quebra do éster resulta em uma reação de transesterificação. É conhecido na literatura que o FD sofre hidrólise alcalina originando como produtos o ácido furóico e a diloxanida [18,24]. Gadkariem et al. [67], verificaram a ocorrência da transesterificação do FD em MeOH quando a mistura foi submetida a aquecimento sob refluxo, nestas condições, foram obtidos o furoato de metila e a diloxanida como produtos. Quando a reação foi realizada em EtOH e propanol os autores verificaram, respectivamente, a formação do furoato de etila e de propila. Assim, a formação do furoato de etila e metila podem ser processos exclusivamente químicos e não envolver etapas eletroquímicas. Durante as eletrólises, são formados carbânions os quais são extremamente básicos e podem abstrair prótons do solvente [68] gerando o respectivo alcóxido, o qual pode promover a reação de transesterificação. Em ambos os solventes, o derivado desalogenado da diloxanida foi identificado como produto de eletrólise.

Assim, constata-se que o derivado desalogenado da diloxanida foi identificado em todos os solventes estudados, indicando que a redução eletroquímica do FD envolve a quebra de suas ligações C-Cl. Verificou-se que a quebra do éster ocorre nos diferentes solventes estudados, não sendo identificado nenhum produto no qual o anel furânico esteja ligado a diloxanida, sugerindo que a quebra do éster envolva todo o FD inicialmente presente.

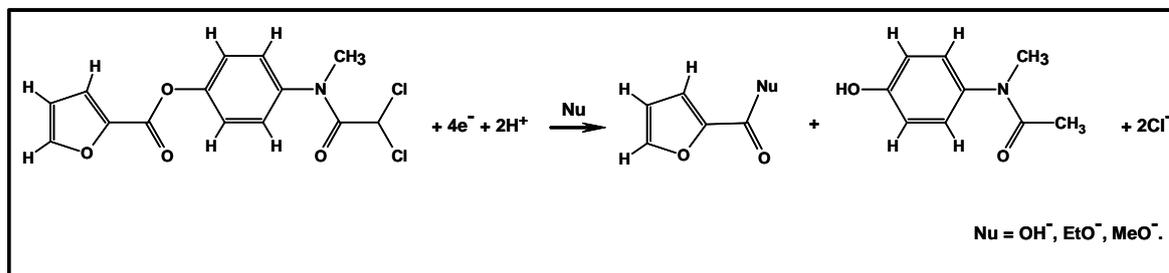
Desta maneira, os resultados obtidos não permitem propor uma seqüência reacional detalhada para a redução eletroquímica do FD que combine as etapas químicas e eletroquímicas. Porém, os resultados obtidos permitem propor uma seqüência simplificada sem o detalhamento das etapas químicas envolvidas. O Esquema 14 apresenta uma seqüência reacional simplificada para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do FD, sendo este válido também para a quebra de sua outra ligação C-Cl.



Esquema 14 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do FD.

Conforme mencionado anteriormente, a seqüência apresentada no Esquema 14 é apenas uma simplificação, não mostrando a etapa na qual o éster é quebrado. Apesar das limitações da seqüência apresentada no Esquema 14, esta é compatível com os resultados experimentais obtidos. Os resultados obtidos por voltametria cíclica sugerem que as ligações C-Cl do FD são quebradas seqüencialmente. A reversibilidade constatada na redução eletroquímica do FD sugere a formação do ânion-radical $[R-Cl]^{\bullet-}$, entretanto, não é possível afirmar que esta espécie seja formada em ambas as quebras de ligações C-Cl. O número de elétrons determinado nas eletrólises sugere a transferência de dois elétrons por ligação C-Cl, mostrando que os radicais formados após a quebra destas ligações são reduzidos aos respectivos carbânions. Com base nos resultados obtidos, não é possível determinar em que etapa ocorre a quebra do éster. Porém, os resultados das identificações dos produtos de

eletrólise podem ser combinados em uma reação global para a redução eletroquímica do FD, a qual é apresentada no Esquema 15.



Esquema 15 - Reação global para a redução eletroquímica do FD.

4.1d - Métodos eletroanalíticos para a determinação de FD

Para o desenvolvimento do método analítico para a quantificação do FD baseado na técnica de LSV, a velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ foi a mais apropriada. Este valor de velocidade de varredura proporciona um tempo de análise relativamente curto, elevada intensidade do sinal voltamétrico e não causa distorções significativas no pico voltamétrico. A Figura 19 apresenta os voltamogramas de varredura linear registrados em diferentes concentrações de FD (C_{FD}), juntamente com a respectiva curva analítica obtida.

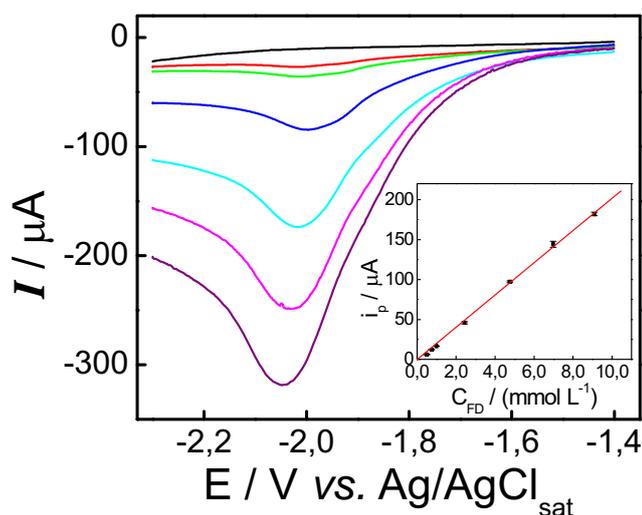


Figura 19 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de FD. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 0,75; (—) 2,5; (—) 5,0; (—) 7,5; (—) 10,0 mmol L⁻¹ de FD. Curva analítica inserida.

Os valores de i_p aumentaram linearmente com a concentração de FD no intervalo de $5,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, acima deste valor de concentração foi observado um desvio negativo da linearidade. Verificou-se que a linearidade da curva analítica obedece à seguinte equação: i_p (μA) = -0,6 + 2,1 × 10⁴ C_{FD} (mol L⁻¹), com coeficiente de correlação linear igual a 0,9995. A partir da curva analítica, foram obtidos os seguintes parâmetros analíticos: sensibilidade (S), que corresponde ao coeficiente angular da curva analítica e Limite de detecção (LD). Os valores obtidos para S e LD foram, respectivamente: 2,1 × 10⁴ μA mol⁻¹ L e 1,8 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. Para a obtenção de LD foi utilizada a seguinte equação: LD = 3sd/SA, onde sd equivale ao desvio padrão da média de oito medidas do branco (eletrólito de suporte) no potencial de redução do FD. Embora o LD não seja um parâmetro requerido para a validação de métodos destinados à análise de medicamentos, este parâmetro é frequentemente calculado em trabalhos da literatura mesmo para métodos analíticos destinados à determinação de fármacos em formulações farmacêuticas. Assim, a determinação do LD dos métodos voltamétricos desenvolvidos para o FD permite uma comparação com outros métodos disponíveis na literatura para a quantificação deste fármaco. Um parâmetro mais representativo do desempenho de um método analítico destinado à análise de medicamentos é a detectabilidade, a qual é definida como a menor concentração do analito que pode ser detectada na célula voltamétrica. Desta maneira, a detectabilidade determinada para a análise do FD pela técnica de LSV corresponde ao primeiro ponto da curva analítica ($5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), uma vez que menores concentrações do fármaco não apresentaram qualquer pico voltamétrico ou aumento do sinal do branco que permitisse a detecção do fármaco.

Previamente ao emprego analítico da técnica de DPV, foi realizado um estudo de otimização dos parâmetros operacionais da técnica. Foram otimizados os seguintes parâmetros: ΔE, tempo de duração do pulso (t_p) e v. O primeiro parâmetro otimizado foi ΔE, a otimização foi realizada variando este parâmetro no intervalo entre 10 e 150 mV, sendo os demais parâmetros mantidos constantes. A Figura 20 apresenta a variação de i_p e da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de ΔE.

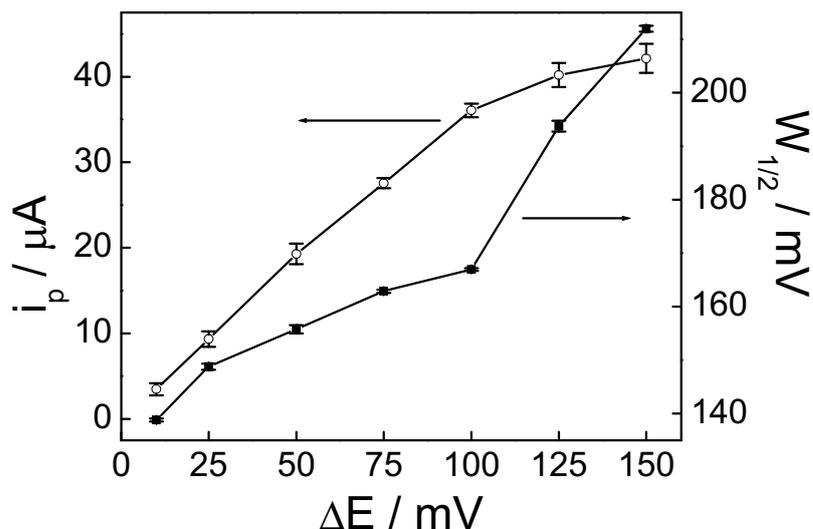


Figura 20 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE . $t_p = 50 \text{ ms}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 20 mostra um aumento linear de i_p com ΔE até o valor de 100 mV, a partir deste valor observa-se um aumento menos pronunciado. Verifica-se também que $W_{1/2}$ sofre pouca variação para valores de ΔE até 100 mV, a partir deste valor observa-se um aumento acentuado da largura do pico. Visando obter a condição onde é obtido um maior valor de i_p (maior intensidade do sinal analítico) sem alargamento considerável do pico (perda de resolução) o valor de ΔE escolhido foi de 100 mV.

O segundo parâmetro otimizado foi o t_p , para isto, ΔE foi mantido igual a 100 mV, valor previamente otimizado, e utilizou-se $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. A Figura 21 apresenta a variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de t_p .

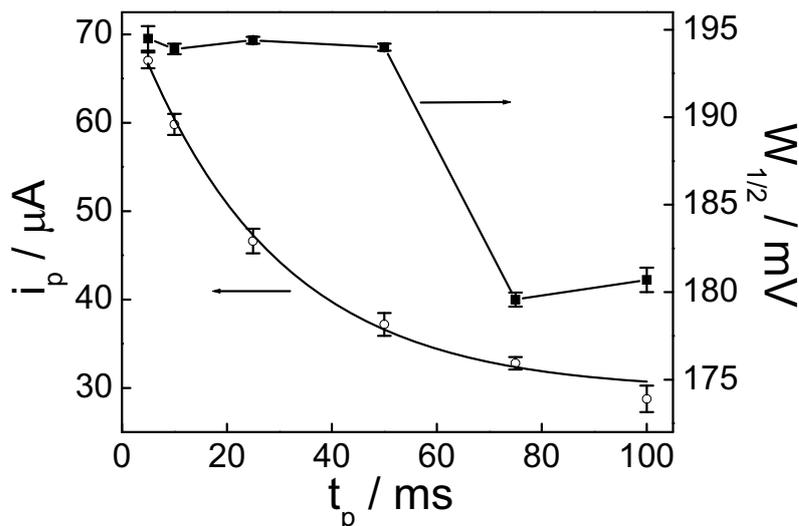


Figura 21 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de t_p . $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{FD}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 21 mostra um decréscimo exponencial de i_p com t_p . Observa-se também que a largura do pico não sofre grandes variações para valores de t_p até 50 ms, a partir deste valor verifica-se que o pico torna-se significativamente mais fino, entretanto, ocorre brusca diminuição dos valores de i_p . Apesar de ter sido verificado que para $t_p = 5,0 \text{ ms}$ obtém-se o maior valor de $W_{1/2}$, observou-se que i_p foi significativamente maior, portanto, o tempo de pulso de 5,0 ms foi escolhido.

O último parâmetro otimizado foi a velocidade de varredura, entretanto, como demonstra a Figura 22, foi observado que este parâmetro não exerce influência significativa nos valores de i_p e $W_{1/2}$. O valor de v escolhido foi de 10 mV s^{-1} .

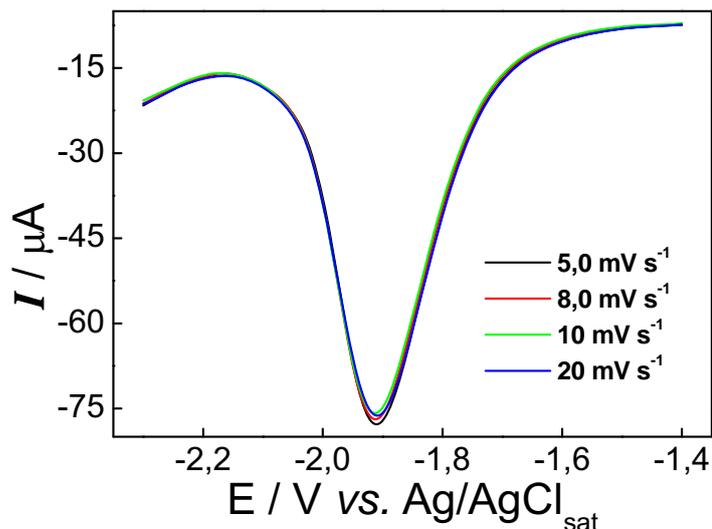


Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 2,0 mmol L⁻¹ de FD. $\Delta E = 100$ mV, $t_p = 5,0$ ms.

Assim, os parâmetros otimizados foram: $\Delta E = 100$ mV, $t_p = 5,0$ ms e $v = 10$ mV s⁻¹, estes parâmetros foram adotados para a construção de uma curva analítica para o FD. A Figura 23 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial registrados em diferentes concentrações de FD, juntamente com a respectiva curva analítica.

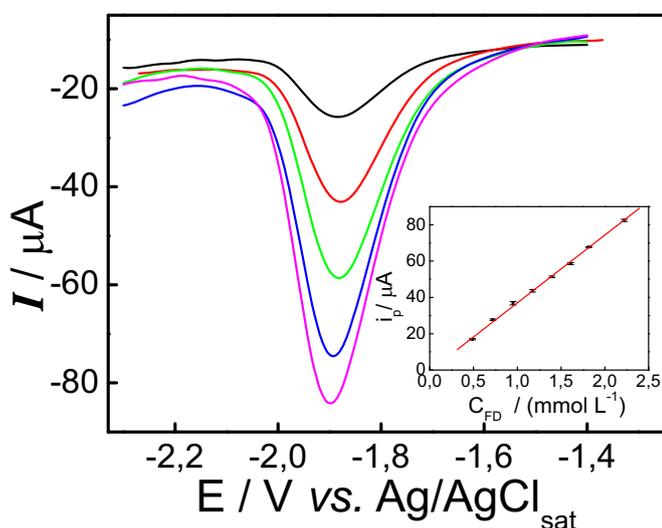


Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de FD. $\Delta E = 100$ mV, $t_p = 5,0$ ms, $v = 10$ mV s⁻¹. (—) 0,5; (—) 1,0; (—) 1,5; (—) 2,0; (—) 2,3 mmol L⁻¹ de FD. Curva analítica inserida.

Empregando-se a técnica de DPV, foi verificada uma relação linear entre i_p e a concentração de FD no intervalo de $5,0 \times 10^{-4}$ a $2,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, a partir deste valor de

concentração verificou-se um desvio negativo da linearidade. A linearidade entre i_p e concentração de FD obedece à seguinte equação: $i_p (\mu\text{A}) = -0,51 + 3,7 \times 10^4 C_{\text{FD}} (\text{mol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9994. O valor de S obtido foi de $3,7 \times 10^4 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$, com LD igual a $7,8 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$, o qual é ligeiramente menor do que o obtido pela técnica de LSV. Assim como observado para a técnica de LSV, a detectabilidade obtida para a técnica de DPV foi de $5,0 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$.

A última técnica voltamétrica empregada para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a quantificação do FD foi a técnica de SWV. Previamente aos estudos analíticos utilizando esta técnica, foi realizada uma otimização dos parâmetros utilizando a mesma metodologia e critérios adotados para a técnica de DPV. O primeiro parâmetro otimizado foi a frequência, sendo a variação de i_p e $W_{1/2}$ com este parâmetro apresentada na Figura 24.

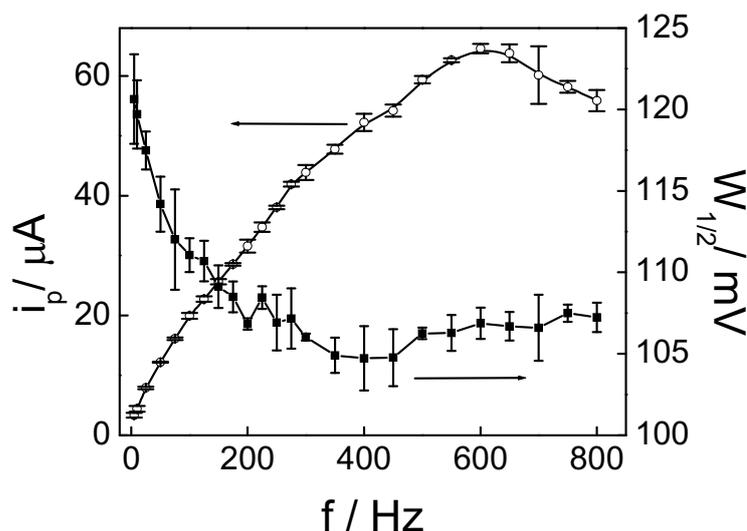


Figura 24 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de f . $\Delta E = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 1,0 \text{ mV}$, $C_{\text{FD}} = 0,75 \text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 24 mostra um aumento de i_p com f , $W_{1/2}$ diminui com o aumento de f até valores próximos a 200 Hz, a partir deste valor, $W_{1/2}$ tende a se estabilizar. Assim, a frequência de 400 Hz foi escolhida por apresentar um alto valor de i_p e um baixo valor de $W_{1/2}$. Após ter sido encontrada a frequência ideal, o segundo parâmetro otimizado foi a amplitude de pulso, a Figura 25 apresenta a variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE .

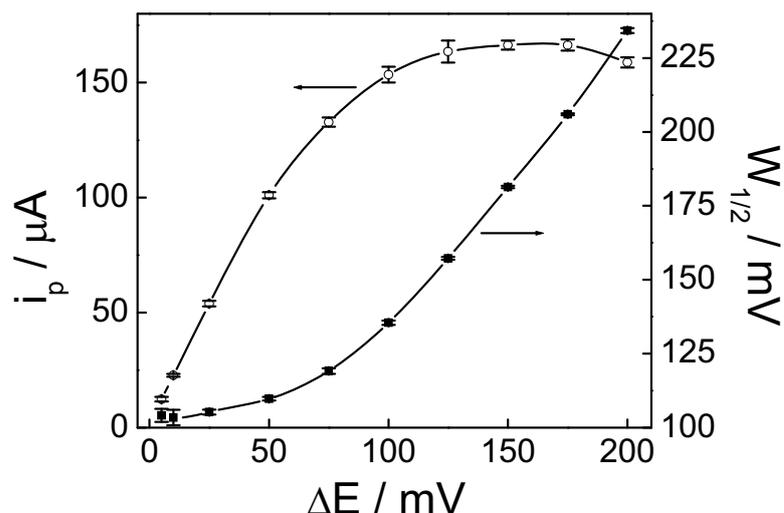


Figura 25 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE . $f = 400\text{Hz}$, $\Delta E_s = 1,0\text{ mV}$, $C_{FD} = 0,75\text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 25 mostra que o pico voltamétrico sofre um alargamento brusco para valores de ΔE maiores do que 100 mV. A corrente de pico aumenta consideravelmente até este valor de ΔE e tende a se estabilizar para maiores valores. De acordo com estes resultados, constata-se que o valor de ΔE de 100 mV é o mais apropriado para ser utilizado nos estudos analíticos. O último parâmetro otimizado foi o incremento de potencial, a Figura 26 apresenta a variação de i_p e $W_{1/2}$ em função deste parâmetro.

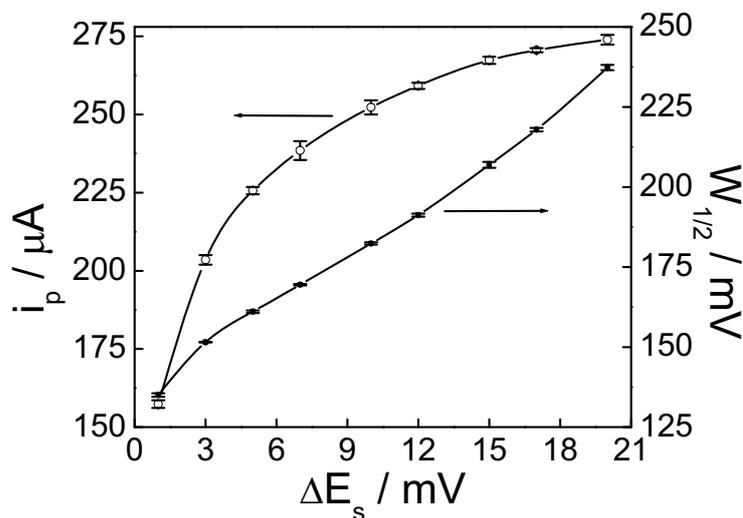


Figura 26 - Variação de i_p e $W_{1/2}$ em função de ΔE_s . $f = 400\text{Hz}$, $\Delta E = 100\text{ mV}$, $C_{FD} = 0,75\text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 26 mostra que tanto i_p quanto $W_{1/2}$ sofrem um aumento gradual em função de ΔE_s . Visando obter uma situação onde fosse obtido o máximo valor de i_p e o menor valor de

$W_{1/2}$, optou-se por utilizar um incremento de potencial de 5,0 mV. Assim, os parâmetros otimizados foram: $f = 400$ Hz, $\Delta E = 100$ mV, $\Delta E_s = 5,0$ mV, estes parâmetros correspondem a uma velocidade de varredura ($f \times \Delta E_s$) igual a $2,0 \text{ V s}^{-1}$.

Após a otimização dos parâmetros da técnica de SWV, foram realizados os estudos em diferentes concentrações de FD. Os voltamogramas obtidos nestes estudos juntamente com a respectiva curva analítica são apresentados na Figura 27.

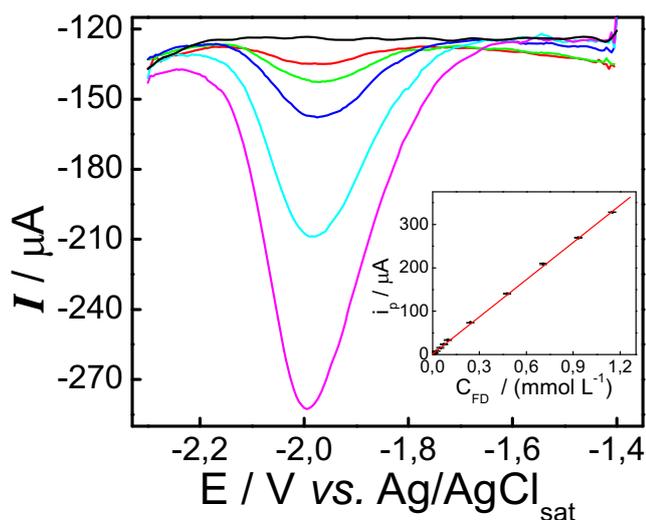


Figura 27 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de FD. $f = 400$ Hz, $\Delta E = 100$ mV, $\Delta E_s = 5,0$ mV. (—) 0,0; (—) 0,025; (—) 0,05; (—) 0,1; (—) 0,25; (—) 0,5 mmol L⁻¹ de FD. Curva analítica inserida.

Verificou-se uma relação linear entre i_p e a concentração de FD segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 0,28 + 2,8 \times 10^5 C_{FD} (\text{mol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9998. Foi observado que i_p varia linearmente com a concentração de FD no intervalo de $7,5 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O valor de S obtido foi de $2,8 \times 10^5 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$, com LD igual a $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o qual é significativamente menor do que os obtidos por LSV e DPV. Novamente, a detectabilidade obtida foi igual ao primeiro ponto da curva analítica ($7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com as três técnicas voltamétricas estudadas.

Tabela 3 - Parâmetros analíticos para a determinação de FD utilizando LSV, DPV e SWV.

Técnica	Intervalo linear / mol L ⁻¹	S / $\mu\text{A L mol}^{-1}$	LD / mol L ⁻¹	Detectabilidade / mol L ⁻¹
LSV	$5,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$
DPV	$5,0 \times 10^{-4} - 2,2 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^4$	$7,8 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-4}$
SWV	$7,5 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-6}$

A Tabela 3 mostra que a técnica de SWV foi a mais sensível e a que apresentou o menor limite de detecção. O desempenho analítico marcadamente superior apresentado pela técnica de SWV é uma consequência da reversibilidade da transferência eletrônica na qual é baseada a detecção eletroquímica do FD, o que faz com que a corrente reversa tenha uma grande contribuição na corrente resultante, causando sua intensificação. Assim, a técnica de SWV é apropriada para a determinação de FD em amostras que apresentem menores teores do fármaco. De modo geral, todas as técnicas voltamétricas avaliadas apresentaram alta sensibilidade e limites de detecção relativamente baixos, indicando que estas técnicas são potencialmente aplicáveis para a quantificação de FD em formulações farmacêuticas. Para todas as técnicas voltamétricas estudadas, os pontos das curvas analíticas são referentes ao valor médio de três medidas. Em todos os casos, os desvios padrão relativos de cada ponto das curvas analíticas foram menores do que 3,0 %, indicando que a repetitividade apresentada pelos métodos voltamétricos é satisfatória.

Os métodos desenvolvidos não puderam ser aplicados para a quantificação de FD em amostras comerciais de formulações farmacêuticas, uma vez que no Brasil não são comercializados medicamentos que utilizam o FD como princípio ativo. Em virtude de existirem trabalhos na literatura propondo métodos analíticos para a quantificação de FD, é interessante realizar uma comparação entre o desempenho analítico dos métodos voltamétricos desenvolvidos e o desempenho de métodos previamente propostos na literatura. Esta comparação é apresentada na Tabela 4, na qual o desempenho analítico da técnica de SWV (a de melhor desempenho) é comparado aos demais métodos disponíveis na literatura.

Tabela 4 - Parâmetros analíticos de diferentes métodos propostos para a quantificação de FD.

Técnica /solvente	Intervalo Linear / mol L ⁻¹	LD / mol L ⁻¹	Referência
SWV / ACN	$7,5 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-6}$	—
UV indireto ^a / NaOH 0,1 mol L ⁻¹	$7,6 \times 10^{-6} - 6,1 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-7}$	18
UV derivativa / EtOH	$6,1 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$	ND ^b	19
UV derivativa / DMF	$2,3 \times 10^{-5} - 4,6 \times 10^{-4}$	ND	20
UV derivativa / MeOH	$6,0 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4}$	ND	21
FIA- UV / EtOH	$6,0 \times 10^{-6} - 4,2 \times 10^{-5}$	ND	22
HPLC / MeOH	$3,1 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-5}$	ND	23
CFS ^c / MeOH	$6,1 \times 10^{-5} - 2,1 \times 10^{-4}$	ND	25

^a Reação do FD com KMnO₄; ^b Valor não declarado; ^c Cromatografia com fluido supercrítico.

Conforme mostra a Tabela 4, o método voltamétrico baseado na técnica de SWV apresenta um intervalo linear e valor de LD compatíveis com os métodos previamente descritos na literatura. Em comparação aos métodos cromatográficos, os voltamétricos apresentam a vantagem de consumir menor quantidade de reagentes e requerer uma instrumentação de menor custo. Entretanto, por se tratar de uma técnica de separação, os métodos cromatográficos permitem determinações simultâneas, tornando possível não apenas a detecção do fármaco como também de seus eventuais produtos de degradação. Além disso, as técnicas cromatográficas são potencialmente mais aplicáveis à amostras mais complexas, tais como fluidos biológicos. Os métodos cromatográficos apresentados na Tabela 4 realizam a determinação simultânea apenas do FD e do metronidazol. De acordo com a literatura [52], a redução eletroquímica deste último envolve a redução de seu grupo nitro, processo que ocorre em valores de potencial muito afastados do potencial observado para o FD. Assim, os métodos voltamétricos desenvolvidos também poderiam, a princípio, ser empregados para a determinação simultânea destes dois fármacos.

Comparado com os métodos espectrofotométricos, os voltamétricos não os superam em termos de simplicidade e custo instrumental. Porém, a determinação indireta do FD por meio da reação com permanganato apresenta limitações quanto à seletividade, uma vez que este reagente é um forte oxidante, podendo oxidar outros componentes da amostra gerando o

manganato, cujo sinal é utilizado para quantificar o FD. Os métodos que utilizam a técnica de espectrofotometria derivativa permitiram a detecção simultânea do FD e de outros fármacos. Porém, neste caso, a seletividade é condicionada a existência de regiões do espectro derivado, nas quais um composto apresente forte absorção e outro não absorva. Por envolver um tratamento matemático, estes métodos requerem programas computacionais mais sofisticados, o que aumenta o custo da análise. Além disso, a manipulação matemática de resultados experimentais pode introduzir erros sistemáticos no método analítico.

Assim, os métodos voltamétricos desenvolvidos, como todo método analítico, apresentam vantagens e desvantagens, sendo sua aplicabilidade dependente da natureza da amostra. O alto potencial necessário para a detecção do FD compromete a seletividade do método, dificultando sua aplicação em amostras mais complexas como fluidos biológicos. Neste tipo de amostra, provavelmente, os métodos voltamétricos somente poderiam ser aplicados após etapas de extração, o que diminuiria a frequência analítica. Porém, em amostras mais simples como formulações farmacêuticas, cujos excipientes geralmente não são eletroativos, os métodos voltamétricos poderiam ser aplicados diretamente sem qualquer etapa de pré-tratamento.

4.2 - Teclozan (TEC)

Assim como observado para o FD, verificou-se que o TEC também não é solúvel em soluções aquosas. Desta maneira, o estudo da redução eletroquímica deste fármaco foi também realizado em ACN, a qual promove a completa solubilização do TEC e apresenta um amplo intervalo útil de potencial.

4.2a - Experimentos voltamétricos

O estudo do comportamento voltamétrico do TEC sobre carbono vítreo foi realizado registrando-se voltamogramas cíclicos em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nestes estudos, foram registrados voltamogramas cíclicos no intervalo de $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ até o início do processo de descarga catódica do sistema solvente/eletrólito. A Figura 28 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados na presença e na ausência de TEC.

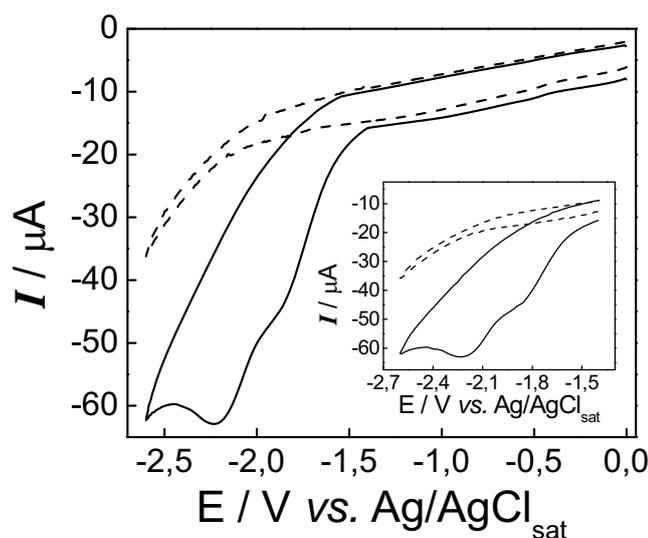


Figura 28 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (---) Ausência de TEC. (—) Presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC. Inserido: ampliação da região entre -1,5 e -2,6 V vs. Ag/AgCl_{sat}.

Novamente, foi constatada a ausência de impurezas eletroativas no sistema ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. As correntes residuais também foram sempre negativas, correspondendo a uma somatória da corrente capacitiva e de uma corrente faradaica associada a um processo catódico, provavelmente associado à presença de água residual. A Figura 28 mostra que o TEC apresenta dois picos catódicos, cujos E_p são -1,8 e -2,2 V vs. Ag/AgCl_{sat} a 100 mV s⁻¹. Observa-se que ambos os picos são largos e, conseqüentemente, não se encontram bem definidos. O perfil alargado destes picos voltamétricos e seus respectivos valores de E_p são semelhantes ao observado para o FD, sugerindo que ambos os picos também estejam relacionados à quebra redutiva de ligações C-Cl. Foi verificada a ausência dos correspondentes picos anódicos na varredura reversa para todas as velocidades de varredura estudadas, conforme mostra a Figura 29.

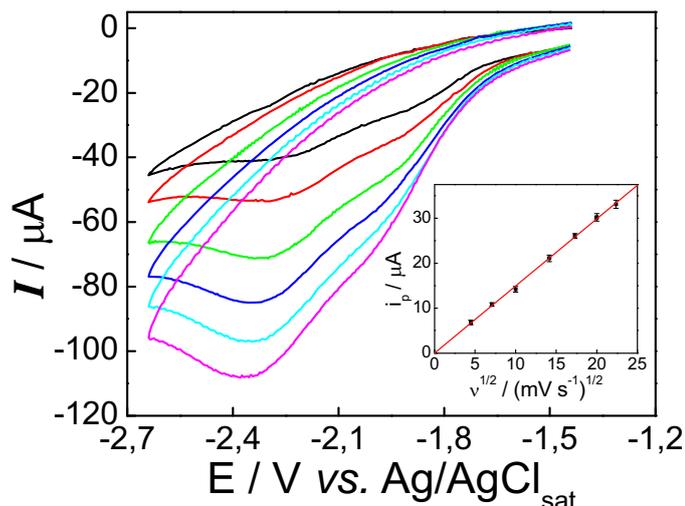


Figura 29 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC em diferentes velocidades de varredura. (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s⁻¹. Inserido: gráfico i_p vs. $v^{1/2}$.

Verificou-se, para o pico em -2,2 V vs. Ag/AgCl_{sat}, uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: i_p (μA) = 1,49 $v^{1/2}$ [(mV s⁻¹)^{1/2}], com coeficiente de correlação linear igual a 0,9992, indicando um processo eletrodico controlado por difusão. Os valores de i_p foram calculados traçando-se uma linha de base antes do pico em -1,8 V vs. Ag/AgCl_{sat}, de modo que as correntes amostradas correspondem à soma de ambos os picos. Na Tabela 5 são apresentados alguns parâmetros voltamétricos relativos ao pico em -2,2 V vs. Ag/AgCl_{sat} determinados em diferentes valores de v .

Tabela 5 - Parâmetros voltamétricos referentes à redução eletroquímica de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

v / mV s ⁻¹	i_p / μA	$-E_p$ / V	$i_p/v^{1/2}$ / μA mV ^{-1/2} s ^{1/2}
50	11	2,25	1,50
100	15	2,30	1,48
200	21	2,35	1,49
300	26	2,38	1,51
400	30	2,39	1,51
500	33	2,40	1,48

A Tabela 5 mostra um deslocamento de E_p para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varredura. Além disso, observa-se que a função corrente não sofre variações significativas com o aumento de v . Estes resultados sugerem que a redução eletroquímica do TEC envolve uma transferência eletrônica irreversível.

De acordo com a equação 1, para sistemas totalmente irreversíveis, deve-se observar uma dependência linear entre E_p e $\ln v$. Este gráfico foi construído para o pico em $-2,2$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$, relativo à redução eletroquímica do TEC, sendo apresentado na Figura 30.

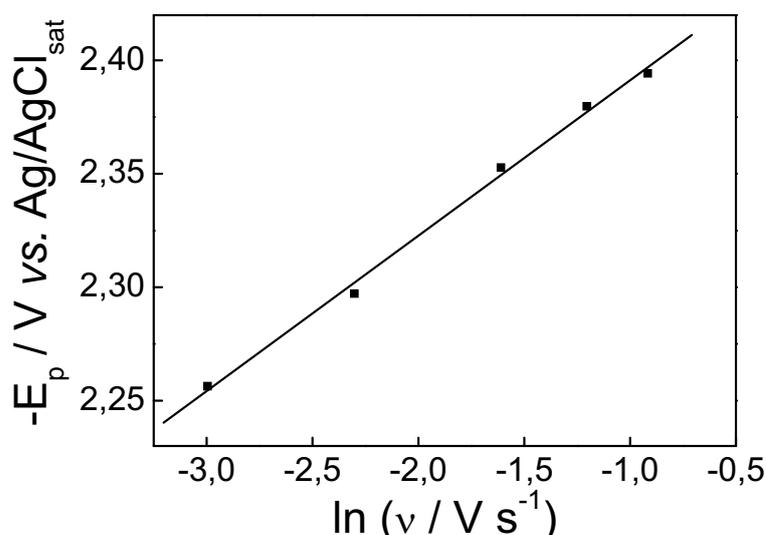


Figura 30 - Gráfico de $-E_p$ vs. $\ln v$ obtido para a redução eletroquímica de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em meio de $\text{ACN}/\text{TBABF}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Conforme mostra a Figura 30, verificou-se uma dependência linear entre E_p e $\ln v$, confirmando o caráter irreversível da redução eletroquímica do TEC. Verificou-se que a linearidade do gráfico de E_p vs. $\ln v$ obedece à seguinte equação: $E_p (\text{V}) = -2,46 - 0,069 \ln(v / \text{V s}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear igual a $-0,998$. A inclinação de 69 mV corresponde a um valor de αn_c de $0,19$. O valor do produto αn_c indica um coeficiente de transferência eletrônica significativamente menor do que $0,5$, o que é concordante com um processo eletródico envolvendo quebra de ligações [39]. Assim, o baixo valor de α é responsável pelo perfil alargado dos picos voltamétricos associados à redução eletroquímica do TEC. Em virtude do pico voltamétrico em $-1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ apresentar-se ainda menos definido, não foi possível a obtenção de seus valores de i_p e E_p . Ao contrário do observado para o FD, verificou-se que para o TEC não são observados os correspondentes

picos anódicos nem mesmo pela técnica de SWV empregando-se diferentes frequências. Este resultado fornece uma evidência adicional da irreversibilidade da redução eletroquímica do TEC.

O comportamento do TEC frente a sucessivas varreduras de potencial foi similar ao observado para o FD, conforme mostra a Figura 31.

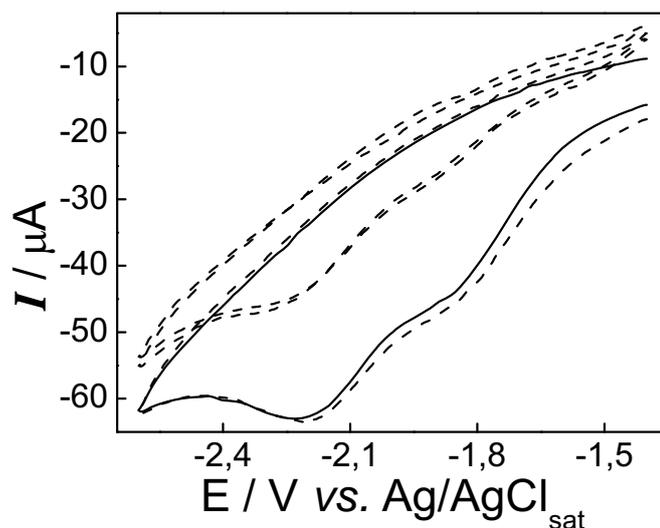


Figura 31 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de TEC. (---) Ciclos sucessivos. (—) Ciclo registrado após 30 s com fluxo de nitrogênio na célula eletroquímica.

Assim como observado para o FD, verificou-se que a redução eletroquímica do TEC não gera espécies que passivam a superfície eletródica, uma vez que o ciclo registrado após 30 s com fluxo de nitrogênio se sobrepõe quase perfeitamente ao primeiro ciclo registrado.

4.2b - Eletrólises a potencial controlado

As eletrólises a potencial controlado para o TEC foram realizadas em triplicata, sendo eletrolisados 15 mL de uma solução 2,0 mmol L⁻¹ do fármaco, aplicando-se -2,4 V vs. Ag/AgCl_{sat}. Nestas eletrólises, empregou-se a mesma célula eletroquímica utilizada para as eletrólises do FD visando a determinação do número de elétrons transferidos. As curvas amperométricas relativas às eletrólises do TEC são apresentadas na Figura 32.

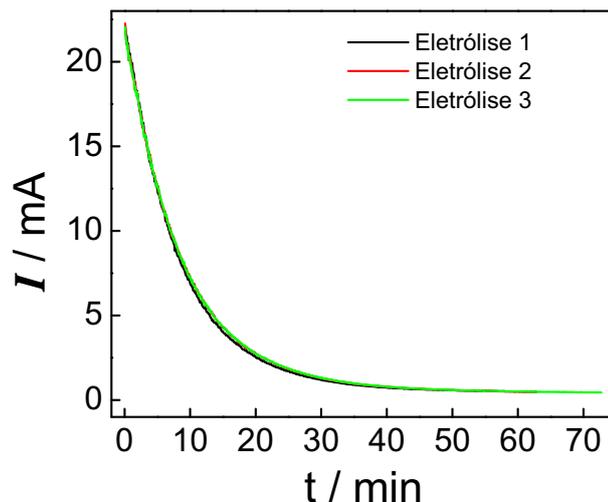


Figura 32 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $E = -2,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com $2 \times 2 \text{ cm}$.

A Figura 32 mostra que as curvas amperométricas relativas às eletrólises do TEC apresentam uma repetitividade bastante adequada. Verifica-se que, após pouco mais de uma hora de eletrólise, a corrente atinge valores próximos a zero, indicando que todo o fármaco foi consumido. O mesmo procedimento adotado para descontar a carga residual durante as eletrólises do FD foi adotado para o TEC. Após esta correção, as curvas amperométricas forneceram um valor médio de carga de $11,7 \pm 0,3 \text{ C}$, correspondendo a um número de elétrons transferidos por mol de TEC igual a $4,0 \pm 0,1$. Este resultado sugere ou que não ocorre quebra redutiva das quatro ligações C-Cl do TEC, ou que estas estejam sendo todas quebradas em um mecanismo envolvendo apenas um elétron por ligação C-Cl. Assim, o número de elétrons encontrado para a redução eletroquímica do TEC sugere que este processo envolva etapas químicas diferentes das envolvidas na redução eletroquímica do FD.

A Figura 33 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados antes e após a eletrólise do TEC.

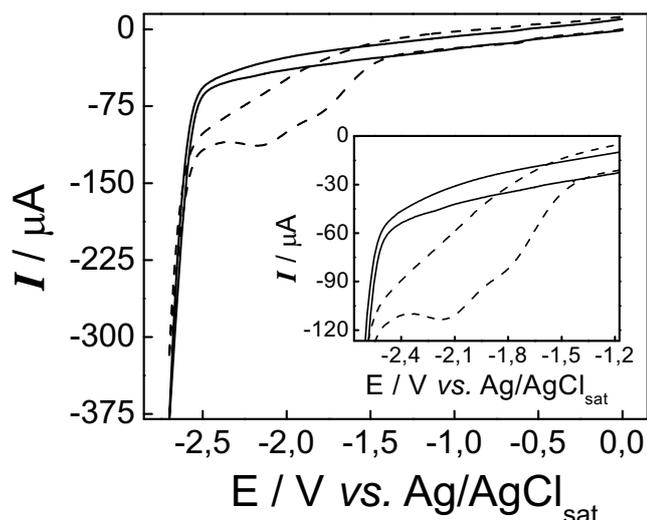


Figura 33 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{TEC}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise. Inserido: ampliação da região entre $-1,2$ e $-2,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$.

A Figura 33 mostra que após as eletrólises todo o fármaco é consumido. Foram registrados voltamogramas cíclicos após as eletrólises nos quais o limite catódico foi sistematicamente estendido. Estes voltamogramas não apresentaram qualquer pico voltamétrico relativo à redução de ligações C-Cl dos produtos de eletrólise, sugerindo que estas ligações estejam ausentes nos produtos eletrogerados. Este resultado sugere que todas as ligações C-Cl do TEC tenham sido quebradas durante as eletrólises. Assim, a quebra redutiva das ligações C-Cl do TEC deve ocorrer segundo um mecanismo envolvendo apenas um elétron por ligação C-Cl.

Assim como o realizado para o FD, a concentração de cloreto gerado durante as eletrólises do TEC foi determinada por meio de sucessivas adições de TBACl à solução recém-eletrolisada. Verificou-se que a solução de TEC recém-eletrolisada também apresentou um pico anódico em $+2,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, o qual aumentou com as sucessivas adições de TBACl. Foi obtida uma relação linear entre i_p com a concentração de cloreto segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 38,4 + 1,6 \times 10^4 C_{\text{Cl}^-} (\text{mol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9986. A partir desta equação, foi possível determinar a concentração média de cloreto eletrogerado, a qual foi igual a $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$, correspondendo a $120 \pm 10 \%$ da concentração inicial do fármaco. Novamente, constata-se que a concentração de Cl⁻ encontrada está abaixo do valor esperado, sugerindo perdas deste íon durante as eletrólises. Considerando a quebra redutiva de todas as ligações C-Cl da molécula de TEC, a concentração de Cl⁻ esperada

deveria ser quatro vezes maior do que concentração inicial de TEC. Embora a concentração de cloreto encontrada seja menor do que a esperada, o fato desta ser maior do que a concentração inicial do fármaco confirma que está ocorrendo a quebra de mais de uma ligação C-Cl da molécula do TEC.

Em virtude do TEC apresentar dois picos voltamétricos foram realizadas novas eletrólises deste fármaco aplicando-se $-1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$; potencial suficiente para promover apenas o processo eletródico responsável pelo primeiro pico voltamétrico. Os demais parâmetros experimentais foram mantidos como os das eletrólises realizadas em $-2,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. As curvas amperométricas relativas a estas eletrólises são apresentadas na Figura 34.

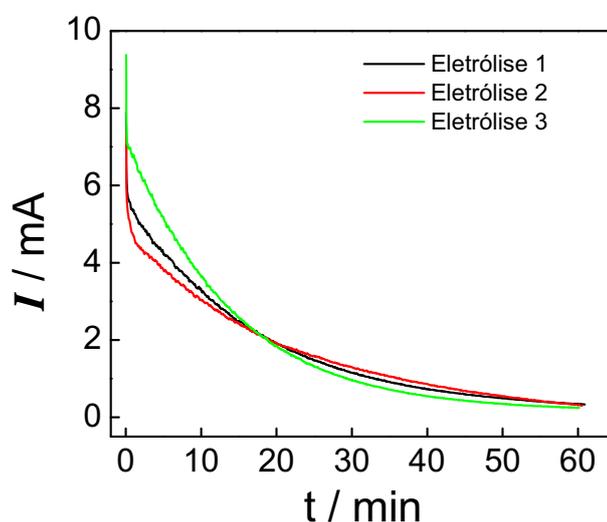


Figura 34 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $E = -1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com $2 \times 2 \text{ cm}$.

A Figura 34 mostra que as curvas amperométricas obtidas para as eletrólises do TEC em $-1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ não são tão repetitivas quanto as curvas obtidas em $-2,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. Verifica-se que uma hora de eletrólise é suficiente para que as correntes obtidas se aproximem de zero. A integração das curvas amperométricas apresentadas na Figura 34 forneceu um valor médio de carga de $6,2 \pm 0,2 \text{ C}$, sendo a carga residual já descontada. O valor de carga obtido corresponde a um número de elétrons transferidos por mol de fármaco igual a $2,2 \pm 0,1$. Assim, verifica-se que os dois picos voltamétricos relativos à redução eletroquímica do TEC estão associados a processos eletródicos distintos. A

Figura 35 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados antes e após a eletrólise realizada em $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$.

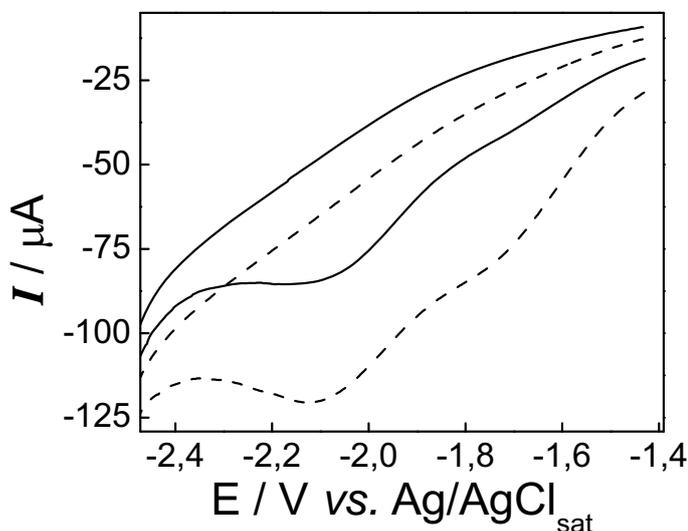


Figura 35 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, $v = 100\text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{TEC}} = 2,0\text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

A Figura 35 mostra que após a eletrólise realizada em $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, o segundo pico voltamétrico relativo à redução do TEC permanece praticamente inalterado, enquanto o primeiro pico desaparece completamente, confirmando que ambos os picos são relativos a diferentes processos eletródicos. Assim, provavelmente, cada pico voltamétrico relativo à redução eletroquímica do TEC esteja associado à quebra de ligações C-Cl em diferentes pontos da molécula de TEC. A concentração média de cloreto encontrada após as eletrólises realizadas em $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ foi de $0,64\text{ mmol L}^{-1}$, correspondendo a $32 \pm 9\%$ da concentração inicial do fármaco, novamente uma baixa porcentagem em relação ao número de mols inicial de TEC.

4.2c - Identificação dos produtos de eletrólise do TEC

Assim como para o FD, previamente a realização das eletrólises do TEC visando a identificação de seus produtos de eletrólise, obteve-se o espectro de H-RMN do fármaco puro, o qual é apresentado na Figura 36. Neste espectro, as integrais são expressas em termos do número de hidrogênios.

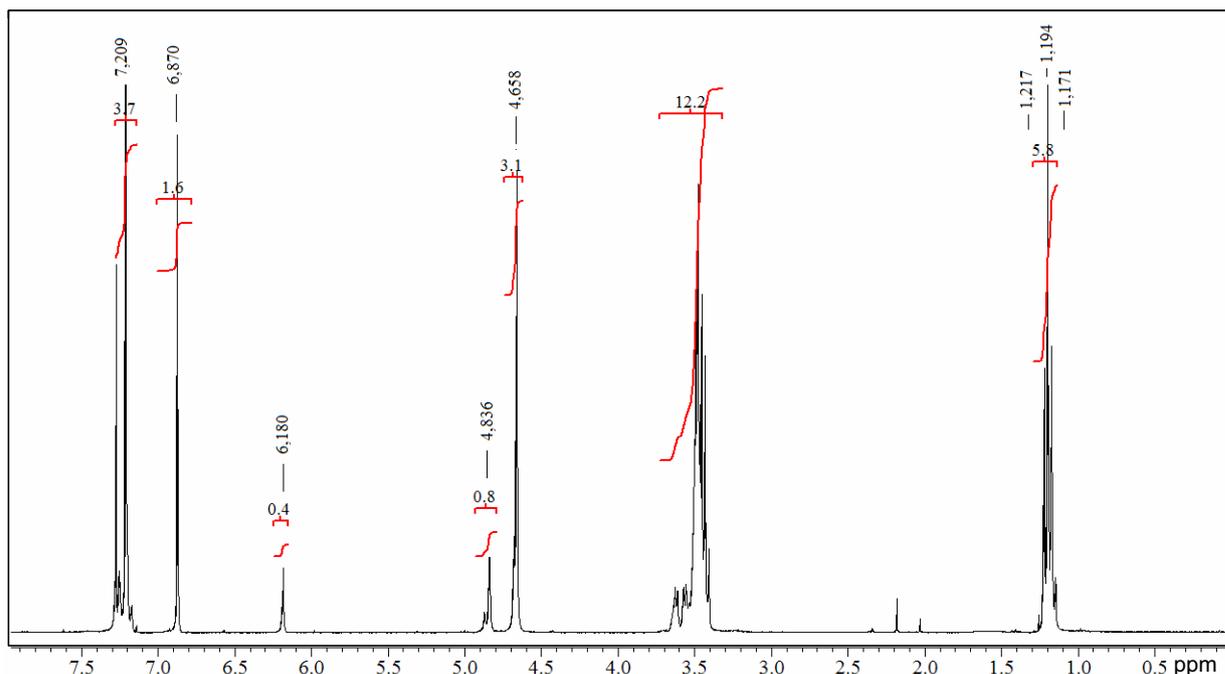


Figura 36 - Espectro de H-RMN do TEC em CDCl_3 . 300 MHz. Massa de TEC igual a 10 mg.

Com base na estrutura molecular do TEC (Figura 2) e das razões entre as integrações, o espectro de H-RMN apresentado na Figura 36 foi interpretado da seguinte maneira: δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 1,19 (6H, t, $J = 7,0$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$); 3,41 – 3,62 (12H, m, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$ e $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4,66 (3,2H, s, ArCH_2N , 80 %); 4,84 (0,8H, s, ArCH_2N , 20 %); 6,20 (0,4H, s, CHCl_2 , 20 %); 6,87 (1,6 H, s, CHCl_2 , 80 %); 7,21 (4H, s, ArH).

O espectro apresentado na Figura 36 demonstra a existência de dois isômeros do TEC, os quais são provenientes da rotação da ligação N-CO da acetamida. A presença de rotâmetros em derivados de acetamida é conhecida e relatada na literatura [69,70]. A Figura 37 mostra uma representação genérica dos dois isômeros resultantes da rotação da ligação N-CO em uma acetamida N-monosubstituída.

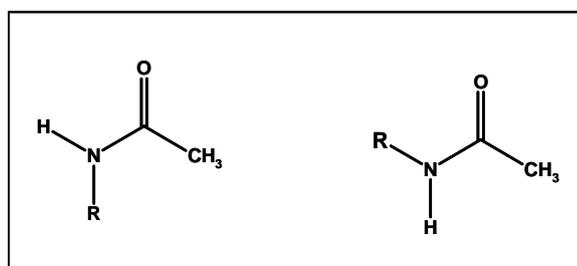


Figura 37 - Representação dos dois isômeros de uma acetamida N-substituída originados pela rotação da ligação N-CO [69].

A presença dos dois isômeros do TEC resulta na duplicação dos sinais relativos aos grupamentos $\text{Ar-CH}_2\text{-N}$ e CHCl_2 , grupos estes, cujo ambiente químico é alterado em virtude da rotação da ligação N-CO. Por meio da razão entre as integrações dos sinais duplicados é possível determinar que a mistura isomérica possui proporção de 80:20 %.

A eficiência do procedimento de extração foi avaliada também para o TEC, preparando-se 15 mL de uma solução contendo 20 mg do fármaco em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o que equivale a uma concentração de TEC igual a $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Esta solução foi submetida ao procedimento de extração, sendo a massa de resíduo obtida igual a 18 mg, o que corresponde a uma recuperação de 90 %. O espectro de H-RMN obtido para este resíduo foi idêntico ao obtido para o padrão do fármaco e isento de sinais associados ao eletrólito de suporte ou aos solventes utilizados na extração, confirmando a eficiência do procedimento adotado.

Previamente a realização das eletrólises do TEC em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foi realizado um estudo voltamétrico do fármaco utilizando este eletrólito de suporte, visando uma comparação com os resultados obtidos previamente em TBABF₄. A Figura 38 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em ambos os eletrólitos de suporte.

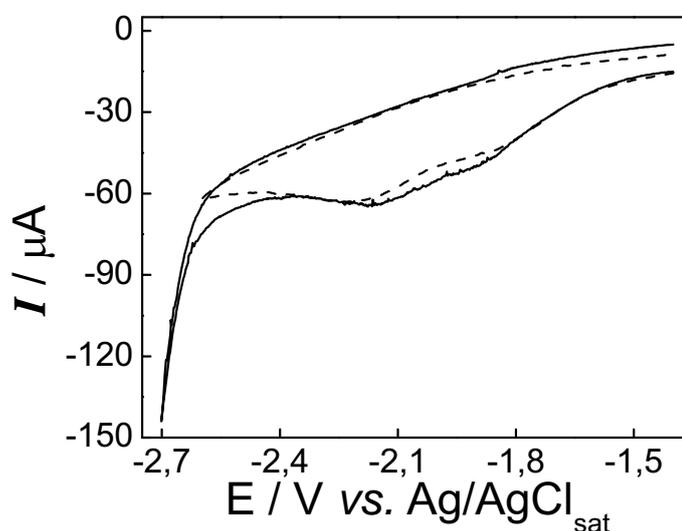


Figura 38 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC a 100 mV s^{-1} . (---) ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (—) ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 38 mostra que a substituição do eletrólito de suporte não exerce influência significativa sobre o perfil voltamétrico do TEC, sendo observadas apenas ligeiras variações nos valores de E_p e i_p . Novamente, foram realizados estudos em função da velocidade de varredura para ambos os eletrólitos de suporte. Estes estudos foram realizados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC no intervalo de v compreendido entre 10 e 300 mV s^{-1} , utilizando um disco de carbono vítreo com $3,0 \text{ mm}$ de diâmetro como eletrodo de trabalho. Em TBABF_4 verificou-se uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 1,8 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$ ($n = 7$), com coeficiente de correlação linear igual a $0,9990$. Para o TEABr verificou-se uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 1,9 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$ ($n = 7$), com coeficiente de correlação linear igual a $0,9992$. Assim, a concordância entre os coeficientes angulares dos gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ é um bom indicativo que a substituição do TBABF_4 pelo TEABr não altera o processo eletrodico. Portanto, os produtos identificados usando este último eletrólito de suporte devem ser representativos daqueles obtidos em TBABF_4 , eletrólito no qual a caracterização voltamétrica do TEC foi previamente realizada. Os valores de i_p utilizados nos estudos em diferentes v foram determinados para o pico em $-2,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, sendo estes valores correspondentes à soma dos dois picos voltamétricos.

As eletrólises do TEC foram realizadas em triplicata utilizando a célula eletroquímica apresentada na Figura 3, sendo eletrolisados 25 mL de uma solução $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC, o que corresponde a 30 mg do fármaco. As curvas amperométricas obtidas nestas eletrólises foram concordantes com as apresentadas na seção anterior, fornecendo o mesmo número de elétrons.

A solução do compartimento catódico da célula de eletrólise foi coletada e submetida ao procedimento de extração. Após a realização deste procedimento, o resíduo obtido foi analisado por H-RMN, sendo o espectro correspondente apresentado na Figura 39.

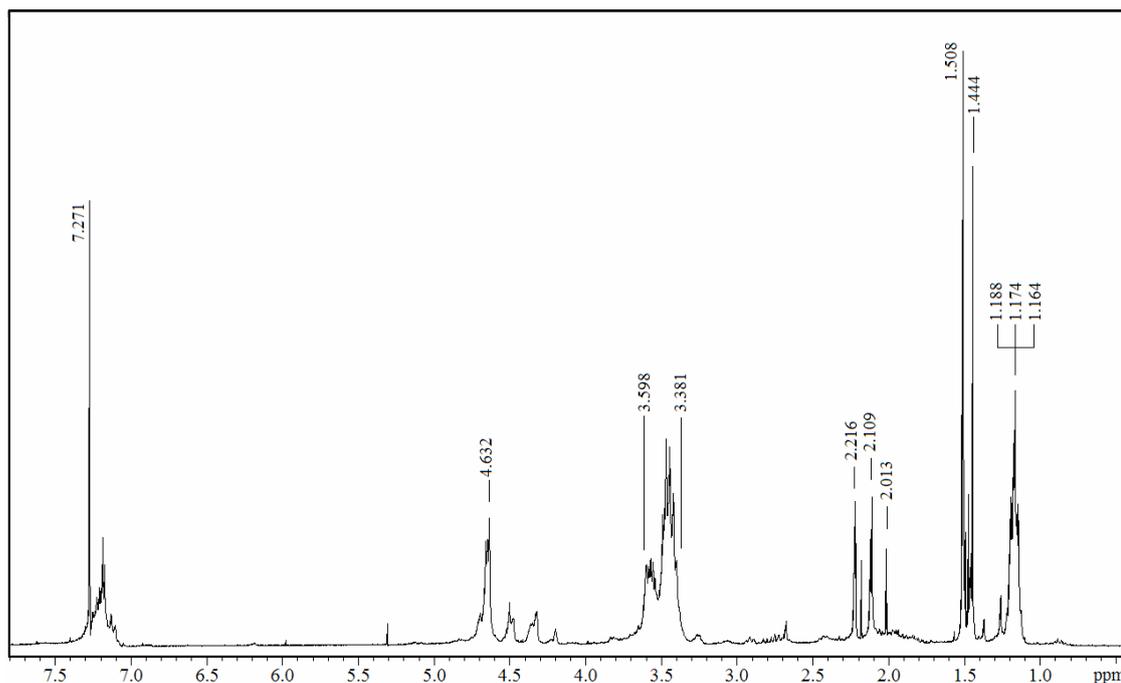


Figura 39 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de TEC eletrolisada em ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹. 300 MHz, CDCl₃.

Conforme mostra a Figura 39, o espectro de H-RMN relativo à eletrólise do TEC mostrou-se extremamente complexo, sugerindo uma mistura de produtos. Observa-se ao longo de todo o espectro desdobramentos incomuns dos sinais, como, por exemplo, o tripleto aparente centrado em 1,17 ppm, o qual provavelmente está associado a metila do grupamento OCH₂CH₃. Este padrão incomum de desdobramentos de sinais pode estar associado à presença de diferentes isômeros. No espectro apresentado na Figura 39 pode-se observar a total ausência do sinal relativo ao grupamento CHCl₂, o qual poderia ter sido reduzido a CH₃, originando grupamentos NCOCH₃, os quais seriam responsáveis pelos singletos observados entre 2,0 e 2,2 ppm. Nestas eletrólises, foi observado desenvolvimento de cor similar ao observado para as eletrólises do FD, sugerindo alterações na molécula do TEC, cuja solução em ACN é incolor. Assim, estas alterações estruturais aliadas a complexidade do espectro de H-RMN apresentado na Figura 39 sugerem a ocorrência de uma série de reações químicas acopladas à redução eletroquímica do TEC, as quais devem envolver espécies radiculares intermediárias.

A massa de resíduo obtida após a extração foi de 12 mg. As análises por CCD, utilizando acetato de etila como fase móvel, revelaram cinco manchas cromatográficas cujos R_f são: 0,11; 0,20; 0,42; 0,49; 0,66, sendo o R_f do TEC nesta placa igual a 0,75. A utilização

da fase móvel acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) promoveu a sobreposição de algumas manchas, resultando em 4 manchas cromatográficas, uma na origem e três com $R_f = 0,08$; $0,17$; $0,48$, sendo o R_f do TEC nesta placa igual a $0,79$. Assim, as análises por CCD confirmaram que as eletrólises do TEC originam uma complexa mistura de produtos. O espectro de H-RMN relativo à fase aquosa não apresentou qualquer sinal além de sinais residuais de solventes utilizados na extração, mostrando que esta fase está isenta de produtos de eletrólise. Assim, estes experimentos não permitiram a identificação de nenhum produto eletrogerado durante as eletrólises do TEC, entretanto, o espectro apresentado na Figura 39 mostra que durante as eletrólises ocorre quebra de ligações C-Cl, o que é confirmado pela ausência dos sinais relativos aos grupamentos CHCl_2 .

Também para o TEC foram realizadas eletrólises em presença de um doador de prótons, sendo estas realizadas na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HFP. Previamente a estas eletrólises, foi realizado um estudo voltamétrico do TEC em presença do doador de prótons. A Figura 40 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC na ausência e na presença de 10 mmol L^{-1} do doador de prótons.

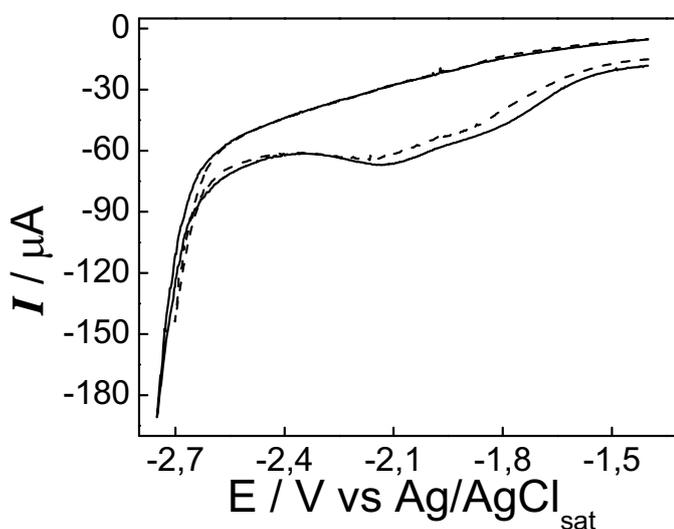


Figura 40 - Voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em meio de ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Presença de 10 mmol L^{-1} de HFP. (---) Ausência do doador de prótons.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 40 mostram que a presença do doador de prótons, mesmo em concentração dez vezes maior do que a do fármaco, não causa alterações significativas no perfil voltamétrico do TEC. O fato de o perfil voltamétrico do

TEC não sofrer grandes variações com a adição de um doador de prótons é concordante com o observado na literatura para a redução eletroquímica de ligações C-Cl de ácidos cloroacéticos [71].

A Figura 41 apresenta as curvas amperométricas relativas às eletrólises realizadas em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do doador de prótons na presença e na ausência de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC.

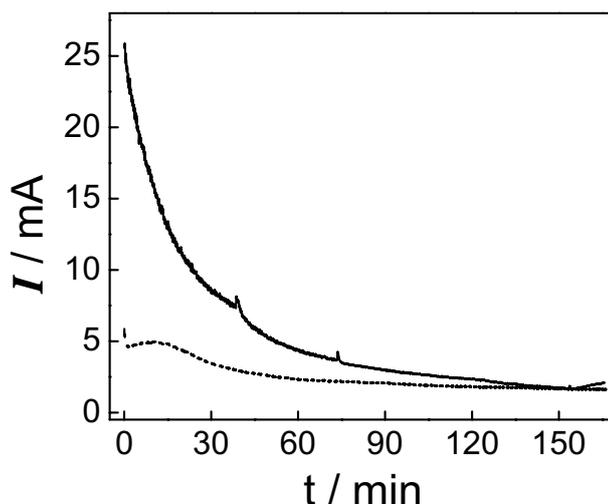


Figura 41 - Curvas amperométricas relativas às eletrólises realizadas em meio de ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $E = -2,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 25 \text{ mL}$. (---) Presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HFP e ausência de TEC (—) Presença de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC + $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HFP. Eletrodo de trabalho: disco de carbono vítreo com $2,5 \text{ cm}$ de diâmetro.

As cargas obtidas na ausência e na presença do fármaco foram, respectivamente, $32,9$ e $55,6 \text{ C}$, portanto a carga efetivamente relacionada à redução do TEC foi igual a $22,7 \text{ C}$, correspondendo à transferência de $3,9 \pm 0,1$ por mol de TEC. Este resultado demonstra que o mesmo número de elétrons é transferido por mol do fármaco independentemente da ausência ou presença de um doador de prótons, o que é concordante com o fato dos valores de i_p obtidos na ausência e na presença do doador de prótons serem muito próximos. As curvas amperométricas obtidas evidenciam que, concomitantemente à redução do TEC, ocorre também a redução de H^+ uma vez que, na presença do doador de prótons, obteve-se um elevado valor de carga mesmo nas eletrólises realizadas na ausência do TEC. Os voltamogramas cíclicos registrados após a realização destas eletrólises indicaram o completo consumo do fármaco.

O espectro de H-RMN relativos à eletrólise realizada em $-2,3$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ na presença do doador de prótons, é apresentado na Figura 42. Neste espectro as integrações são expressas em termos do número de hidrogênios.

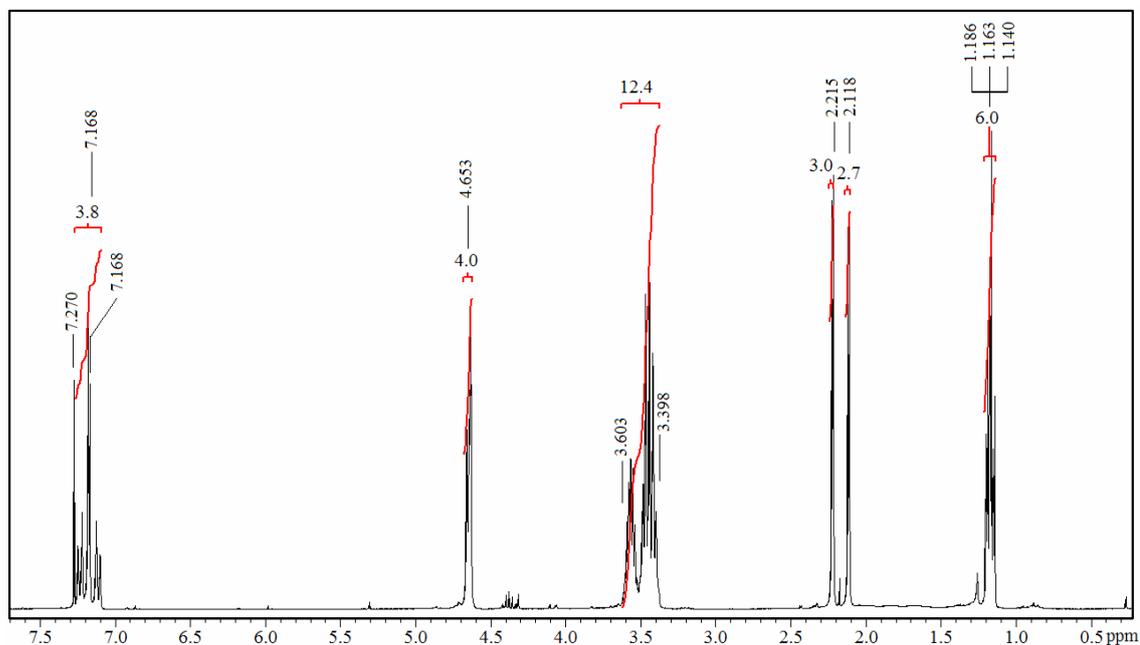


Figura 42 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica proveniente da eletrólise de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em presença de doador de prótons. 300 MHz, CDCl_3 .

O espectro de H-RMN apresentado na Figura 42 revela a presença de um único composto, o qual foi identificado como o derivado desalogenado do TEC, segundo a interpretação: δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 1,14-1,19 (6H, m, 2 x OCH_2CH_3 , possível identificar um tripleto principal centrado em 1,16 com $J = 6,9$ Hz); 2,12 e 2,22 (3H, 3H, s, s, 2 x COCH_3); 3,4 – 3,6 (12H, m, 2 x OCH_2CH_3 e 2 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4,65 (4H, s aparente, ArCH_2N); 7,13 – 7,25 (4H, m, ArH , singleto aparente em 7,18). A razão entre as integrações e os deslocamentos químicos dos sinais não deixam dúvidas quanto à espécie química presente. Este espectro apresenta algumas particularidades, como o desdobramento incomum dos sinais e o fato das metilas dos grupamentos COCH_3 não serem equivalentes. Estas particularidades do espectro podem estar associadas à presença de diferentes isômeros, interações intermoleculares, ou mesmo devido à concentração da espécie. A amostra foi diluída em um fator de dois e analisada novamente. O espectro de H-RMN obtido nesta condição mostrou um menor desdobramento de sinais, entretanto, as duas metilas dos grupamentos COCH_3

continuaram a originar dois singletos distintos. As análises por CCD mostraram apenas uma única mancha cromatográfica utilizando tanto acetato de etila quanto a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) como fase móvel, os R_f obtidos para as duas fases móvel foram, respectivamente, 0,42 e 0,48, sendo os R_f relativos ao TEC em ambas as fases móvel iguais a 0,75 e 0,79, respectivamente. As análises por CCD das amostras provenientes das eletrólises realizadas na ausência de doador de prótons mostraram manchas cromatográficas com os mesmos valores de R_f . Este resultado sugere que o derivado desalogenado do TEC também é formado durante as eletrólises realizadas na ausência de doador de prótons. Nas eletrólises realizadas em presença de doador de prótons, não foi verificado desenvolvimento de coloração, o que é coerente com a semelhança estrutural entre o TEC e seu derivado desalogenado.

A massa de resíduo obtida foi de 21 mg, o que, considerando a massa molar do derivado desalogenado do TEC ($364,5 \text{ g mol}^{-1}$), corresponde a $5,8 \times 10^{-5} \text{ mol}$, fornecendo um rendimento, em relação ao número de mols inicial de TEC, igual a 96 %. Neste caso, o rendimento obtido é muito mais exato, uma vez que no espectro não são observados sinais relativos à água ou solventes utilizados na extração. Para diferentes eletrólises realizadas, a massa de resíduo variou entre 18 e 21 mg, correspondendo a rendimentos, em termos de número de mols, entre 82 e 96 % ($N = 3$). A análise por H-RMN da fase aquosa mostrou a ausência de qualquer produto de eletrólise. O elevado rendimento obtido permite afirmar que o derivado desalogenado do TEC é o único produto de sua redução eletroquímica na presença de um doador de prótons, confirmando que, nestas condições experimentais, a redução eletroquímica do TEC envolve unicamente a quebra de todas as suas ligações C-Cl.

De acordo com o mecanismo clássico para a quebra redutiva de ligações C-Cl [30], este processo envolve a transferência de dois elétrons por ligação. Assim, segundo este mecanismo, a quebra das quatro ligações C-Cl do TEC deveria envolver oito elétrons e não quatro conforme observado. Este resultado demonstra que as ligações C-Cl do TEC sofrem quebra redutiva envolvendo a transferência de apenas um elétron por ligação. Alguns trabalhos têm demonstrado a possibilidade da ocorrência de quebra redutiva de ligações C-Cl com a transferência de apenas um elétron por ligação. Este comportamento não usual tem sido atribuído à formação da espécie Cl^\bullet ao invés de Cl^- [41], a reações entre o carbânion eletrogerado após a segunda transferência eletrônica e a molécula inicial [45] ou ainda a

reações de hidrogenação do radical eletrogerado após a primeira transferência eletrônica, o que suprime sua subsequente redução ao carbânion [38].

Assim, provavelmente, as reações químicas acopladas à redução eletroquímica do TEC observadas na ausência do doador de prótons devem envolver o radical formado após a primeira transferência eletrônica. Estas reações químicas suprimiriam a transferência do segundo elétron responsável pela redução do radical ao carbânion correspondente. Em presença do doador de prótons, o radical eletrogerado deve sofrer uma reação de hidrogenação imediatamente após sua formação, impedindo completamente sua redução ao carbânion. Em presença do doador de prótons, verificou-se que a redução do TEC ocorre concomitantemente à redução de H^+ , o que foi confirmado pelo elevado valor de carga obtido nestas eletrólises. Assim, verifica-se que a redução de H^+ ocorre em elevada extensão nas condições de eletrólise. Portanto, é muito provável que o radical formado após a primeira transferência eletrônica sofra uma hidrogenação pela espécie H^+ , a qual é um intermediário da redução de H^+ a H_2 . Desta forma, em virtude destas espécies estarem sendo simultaneamente formadas junto à superfície do eletrodo, suas concentrações locais são elevadas, o que aliado à elevada reatividade de espécies radicalares deve promover a rápida reação entre a espécie H^+ e o radical eletrogerado após a primeira transferência eletrônica. Assim, tanto na presença quanto na ausência de doador de prótons as reações químicas envolvendo o radical eletrogerado, evitariam sua redução ao carbânion, acarretando na quebra reductiva das ligações C-Cl do TEC com a transferência de apenas um elétron por ligação.

Em virtude do TEC apresentar dois picos voltamétricos, foram realizadas também eletrólises na presença de um doador de prótons aplicando-se $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, potencial suficiente para promover apenas o processo eletródico responsável pelo primeiro pico voltamétrico. Estas eletrólises forneceram um valor médio de carga, já descontada a carga residual, de $12,5\text{ C}$, correspondendo a $2,2 \pm 0,1$ elétron por mol de TEC. O número de elétrons encontrado nestas eletrólises é concordante com o obtido aplicando-se $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ na ausência do doador de prótons. O voltamograma cíclico registrado após esta eletrólise mostrou o completo desaparecimento do primeiro pico voltamétrico ($-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$), enquanto o segundo ($-2,2\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) permaneceu praticamente inalterado, conforme mostra a Figura 43.

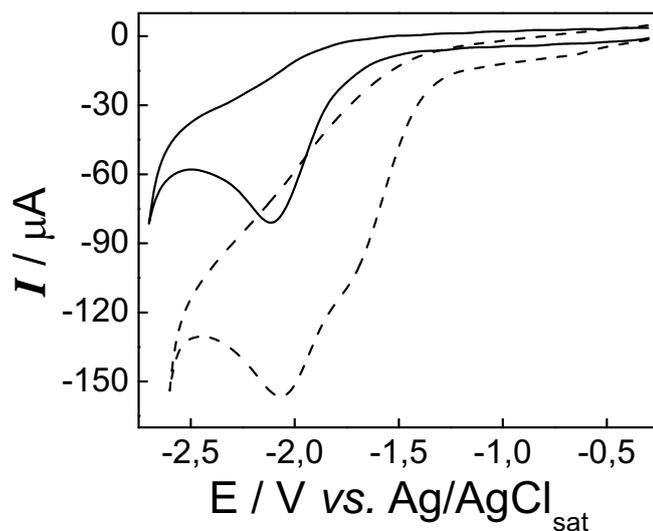


Figura 43 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{TEC}} = 2,4 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

Este resultado é análogo ao observado na ausência de doador de prótons e confirma que os dois picos voltamétricos relativos ao TEC estão associados a diferentes processos eletródicos. O espectro de H-RMN obtido na análise dos produtos desta eletrólise é apresentado na Figura 44, sendo as integrações expressas em termos percentuais.

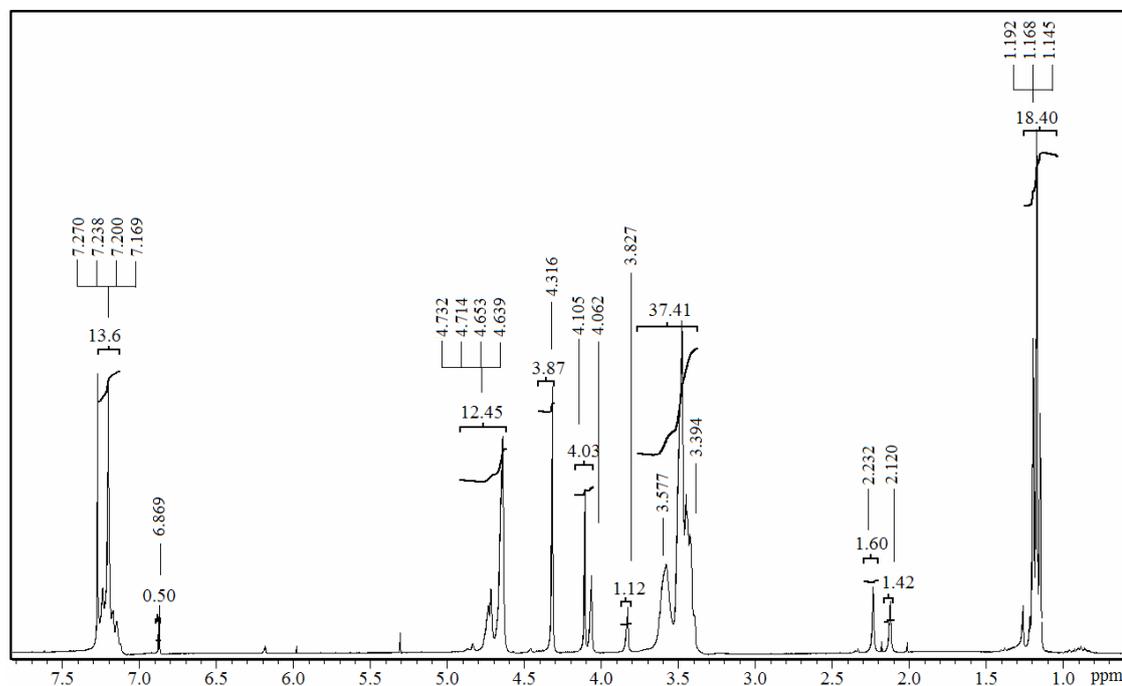
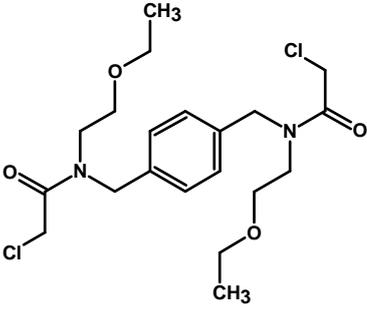
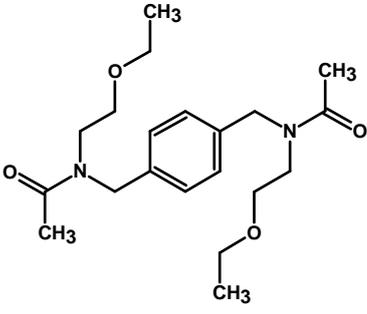
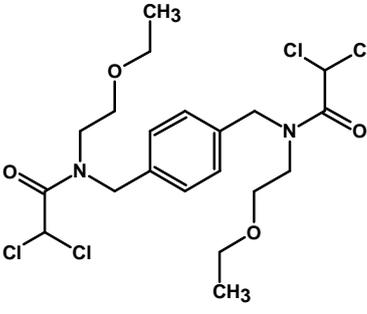


Figura 44 - Espectro de H-RMN do resíduo relativo à fase orgânica proveniente da eletrólise de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em presença de doador de prótons a $-1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. 300 MHz, CDCl_3 .

O espectro apresentado na Figura 44 mostra a existência de uma mistura de compostos. A Tabela 6 apresenta a interpretação deste espectro juntamente com as respectivas estruturas químicas propostas. Nesta tabela é apresentada também a proporção de cada componente da mistura.

Tabela 6 - Atribuição dos sinais do espectro de H-RMN apresentado na Figura 44 e respectivas estruturas químicas propostas.

	Interpretação do espectro δ (ppm, 300 MHz, CDCl ₃)	Estrutura proposta
Composto A	1,14-1,19 (6H, m, 2 x OCH ₂ CH ₃) 3,8; 4,0; 4,1; 4,3 (4H, s, s,s,s, 2 x CH ₂ Cl) 3,4 – 3,6 (12 H, m, 2 x OCH ₂ CH ₃ e 2 x OCH ₂ CH ₂ N); 4,64 (4H, m, ArCH ₂ N); 7,13 – 7,25 (4H, m, ArH, singleto aparente em 7,2).	 (70 %)
	Composto B	 (15 %)
Teclozan	1,14-1,19 (6H, m, 2 x OCH ₂ CH ₃); 2,12 e 2,23 (3H, 3H, s, s, 2 x COCH ₃); 3,4 – 3,6 (12H, m, 2 x OCH ₂ CH ₃ e 2 x OCH ₂ CH ₂ N); 4,64 (4H, m, ArCH ₂ N); 7,13 – 7,25 (4H, m, ArH, singleto aparente em 7,2).	 (15 %)

O espectro obtido na análise dos produtos desta eletrólise também apresentou padrões incomuns de desdobramentos e replicação de sinais. Verifica-se que o sinal relativo aos grupamentos CH_2Cl aparece quadruplicado, sugerindo a presença de isômeros. Para se definir o valor de integração por H para cada um dos compostos, as integrais dos diferentes sinais relativos ao grupamento CH_2Cl foram somadas. Seguindo este procedimento, foram obtidos os seguintes valores: 2,25/H; 0,5/H e 0,5/H para os compostos A, B e C, respectivamente. A partir destes valores, foram calculados os valores esperados de integração para 6, 12 e 4 H para cada composto. Estes valores foram somados, sendo o resultado obtido concordante com os valores experimentais de integração obtidos para os grupos de sinais centrados em 1,16; 3,4 e 4,6 ppm, os quais correspondem, respectivamente, a 6, 12 e 4 H. A integração experimental obtida para os H aromáticos mostrou-se ligeiramente aumentada em relação ao valor esperado. Este efeito pode ser atribuído à presença do sinal residual do CDCl_3 em 7,27, cuja integração não pôde ser satisfatoriamente descontada.

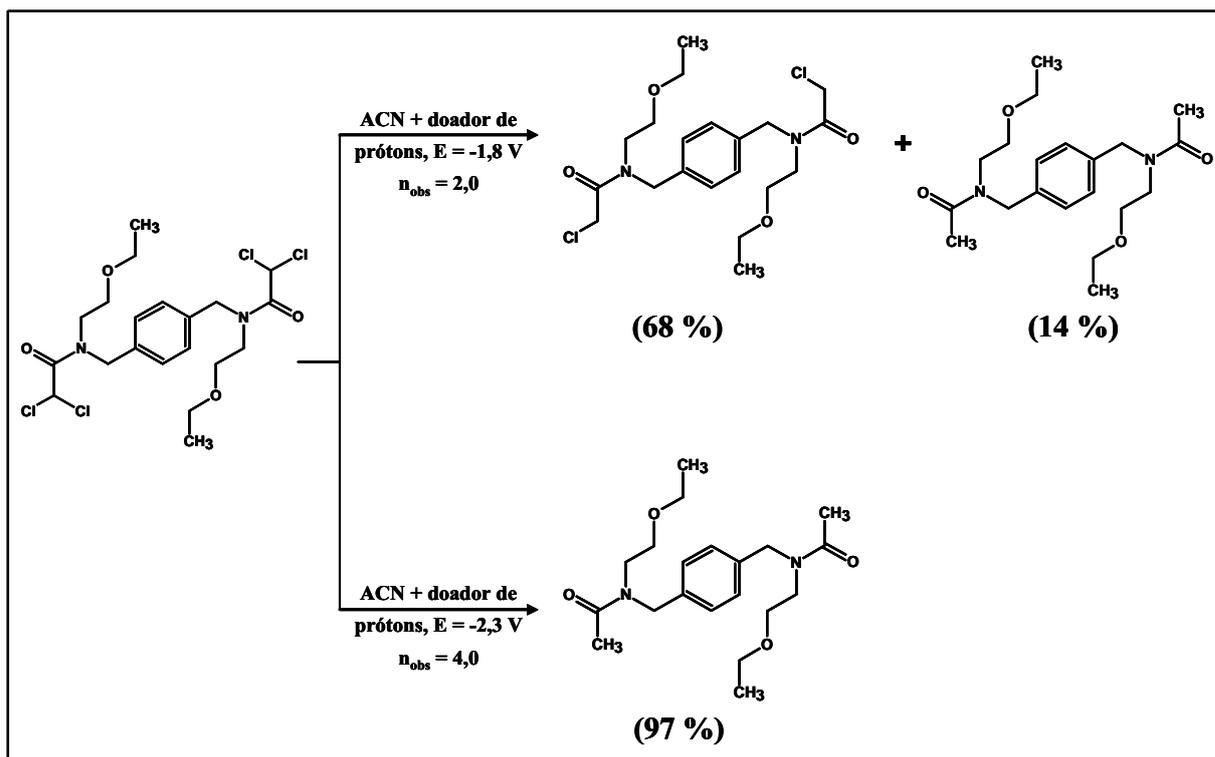
Os estudos por CCD sugeriram a presença de apenas três compostos. Utilizando acetato de etila como fase móvel foram obtidos os seguintes R_f : 0,30; 0,42; 0,75, sendo o R_f do TEC nesta placa cromatográfica igual a 0,75. Utilizando como fase móvel a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) foram obtidos os seguintes R_f : 0,19, 0,48 e 0,79, sendo o R_f do TEC nesta placa igual a 0,79. Assim, os valores de R_f obtidos são concordantes com a presença do TEC e de seu derivado desalogenado. Estes resultados sugerem que o derivado do TEC cujos grupos CHCl_2 foram reduzidos a CH_2Cl é responsável pela mancha cromatográfica com R_f igual a 0,30 e 0,19, utilizando como fase móvel, respectivamente, acetato de etila e a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v). Uma comparação entre os R_f obtidos na análise dos produtos eletrogerados na ausência e na presença do doador de prótons, sugere que o derivado do TEC contendo grupamentos CH_2Cl é também formado na ausência do doador de prótons.

A massa de resíduo obtida nesta eletrólise foi de 24 mg, por meio das proporções determinadas pelo espectro apresentado na Figura 44, sabe-se que a massa dos compostos A (massa molar igual a $433,4 \text{ g mol}^{-1}$), B e do TEC são, respectivamente: 18; 3 e 3 mg. Estas massas correspondem a $4,1 \times 10^{-5}$; $8,2 \times 10^{-6}$ e $6,0 \times 10^{-6}$ mol dos compostos A, B e TEC, respectivamente. Portanto, a soma do número de mols dos compostos identificados é igual a $5,5 \times 10^{-5}$, correspondendo a 92 % do número de mols de TEC inicialmente presente. Para diferentes eletrólises realizadas em $-1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, o rendimento, em termos do

número de mols inicial do fármaco, variou entre 89 e 93 % (N = 3), sendo que a proporção entre os compostos permaneceu praticamente constante. Em todas as eletrólises verificou-se a presença do TEC, indicando que parte do fármaco não sofre redução quando a eletrólise é realizada a $-1,8\text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. As elevadas porcentagens de recuperação em relação ao número inicial de mols de TEC mostram que, nas condições experimentais adotadas, o derivado desalogenado do TEC e seu derivado contendo os grupamentos CH_2Cl são os únicos produtos da redução eletroquímica do TEC.

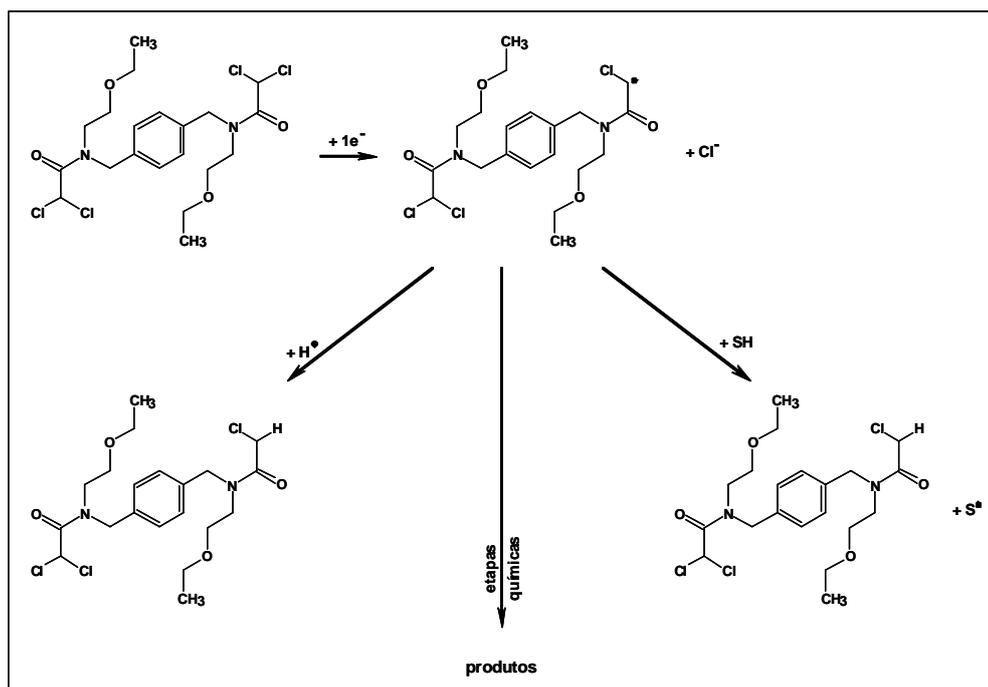
As eletrólises realizadas nos dois potenciais evidenciaram que os dois picos voltamétricos do TEC estão associados à quebra das ligações C-Cl em diferentes pontos da molécula do TEC, sendo o primeiro pico voltamétrico relativo à redução dos grupamentos CHCl_2 a CH_2Cl , enquanto o segundo promove a redução dos grupos CH_2Cl a CH_3 . Assim, a quebra de uma das ligações C-Cl de um grupamento CHCl_2 torna a segunda quebra neste mesmo grupo energeticamente desfavorável, fazendo com que ocorra em potenciais ligeiramente mais negativos. Este comportamento pode ser explicado em termos da densidade eletrônica no átomo de carbono ligado aos átomos de cloro. Na presença de dois átomos de cloro, o carbono encontra-se com um caráter muito positivo, pois os elétrons estão deslocalizados em direção aos átomos de cloro. A quebra de uma das ligações C-Cl deste carbono diminui seu caráter positivo em relação ao outro átomo de carbono ligado aos dois átomos de cloro. Conseqüentemente, nesta etapa, torna-se energeticamente mais favorável a redução do outro átomo de carbono cujo caráter mais positivo devido aos dois átomos de cloro facilita a recepção de um elétron adicional. Desta forma, em virtude destes efeitos não há formação do produto contendo um grupamento metila em uma extremidade da molécula e um grupamento CHCl_2 na outra extremidade.

O Esquema 16 apresenta uma representação simplificada da redução eletroquímica do TEC, a qual sumariza os resultados obtidos para este fármaco nas eletrólises realizadas na presença do doador de prótons.



Esquema 16 - Seqüência reacional global para a redução eletroquímica do TEC na presença de um doador de prótons.

Desta maneira, a irreversibilidade da redução eletroquímica do TEC, aliada ao valor de α significativamente menor do que 0,5, sugere que as transferências eletrônicas envolvidas para a redução eletroquímica do TEC ocorrem conjuntamente com a quebra das ligações C-Cl. O fato de ter sido verificada transferência de apenas um elétron por ligação C-Cl sugere que os radicais eletrogerados após a quebra destas ligações sofrem reações químicas, as quais impedem a subsequente redução dos radicais aos respectivos carbânions. Em presença do doador de prótons, foi verificado que os radicais eletrogerados sofrem reações de hidrogenação, originando como único produto o derivado desalogenado do TEC com elevado rendimento. Na ausência de um doador de prótons, os radicais eletrogerados podem abstrair átomos de hidrogênio do sistema solvente/eletrolito, ou ainda sofrer reações de dimerização, conduzindo a uma complexa mistura de produtos. Assim, de acordo com estes resultados, pode-se propor a seqüência reacional apresentada no Esquema 17 para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do TEC, sendo esta seqüência válida também para as demais ligações C-Cl deste fármaco.



Esquema 17 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl do TEC.

4.2d - Métodos eletroanalíticos para a determinação de TEC

Os estudos visando o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para quantificação do TEC foram realizados utilizando a mesma metodologia empregada para o FD. Para a construção das curvas analíticas e de adição de padrão foi realizada a correção de volume, visando corrigir a diluição sofrida pelo analito em função das sucessivas adições da solução estoque de TEC. Os métodos eletroanalíticos foram desenvolvidos utilizando as técnicas de LSV, DPV e SWV. Previamente ao desenvolvimento dos métodos voltamétricos para quantificação do TEC, foi realizado um estudo de otimização dos parâmetros operacionais de cada técnica voltamétrica empregada. Estes estudos foram realizados utilizando a mesma metodologia e critérios adotados para o FD, ou seja, os estudos de otimização foram realizados de modo a se obter a maior intensidade do sinal analítico (maior valor de i_p) sem perda significativa de resolução (menor $W_{1/2}$). Seguindo esta metodologia foram obtidos os seguintes parâmetros otimizados: para LSV $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; para a DPV $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$ e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$; para SWV $\Delta E = 75 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$, e $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, estes parâmetros equivalem a uma velocidade de varredura de 500 mV s^{-1} . Utilizando estes parâmetros otimizados, foram registrados voltamogramas em diferentes concentrações de

TEC, os quais foram utilizados para a construção de curvas analíticas. Estes voltamogramas obtidos com as técnicas de LSV, DPV e SWV são apresentados, respectivamente, na Figura 45, na Figura 46 e na Figura 47. Nestas figuras são apresentadas também as respectivas curvas analíticas.

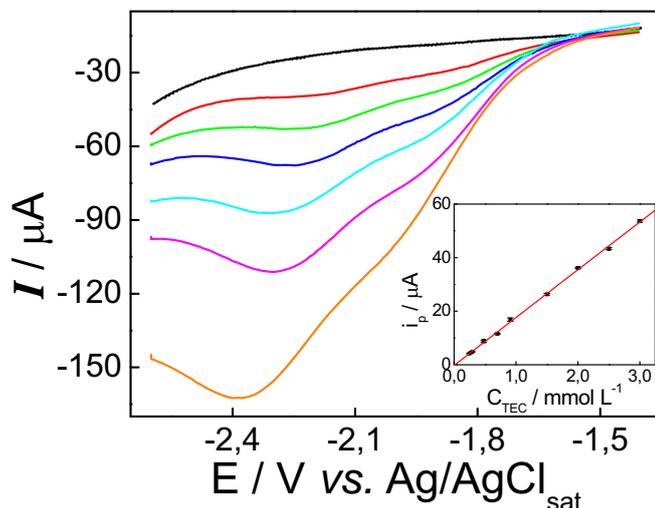


Figura 45 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,0; (—) 0,3; (—) 0,6; (—) 1,0; (—) 1,5; (—) 2,0; (—) 3,0 mmol L⁻¹ de TEC. Curva analítica inserida.

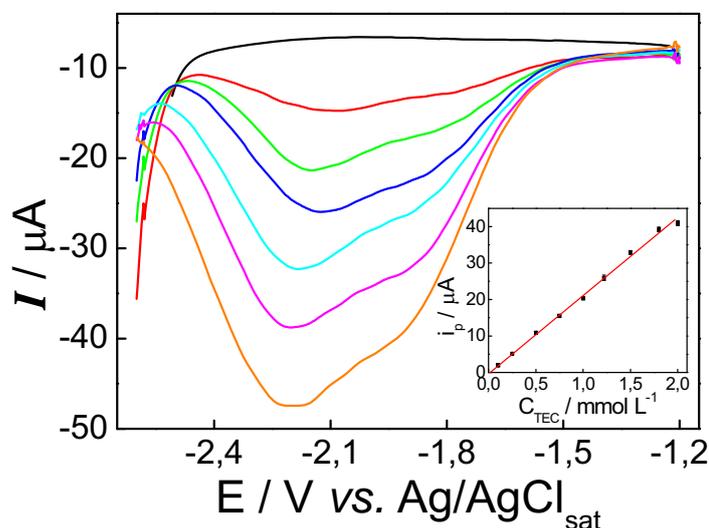


Figura 46 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. (—) 0,0; (—) 0,25; (—) 0,50; (—) 0,75; (—) 1,0; (—) 1,25; (—) 1,5 mmol L⁻¹ de TEC. Condições voltamétricas: $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Curva analítica inserida.

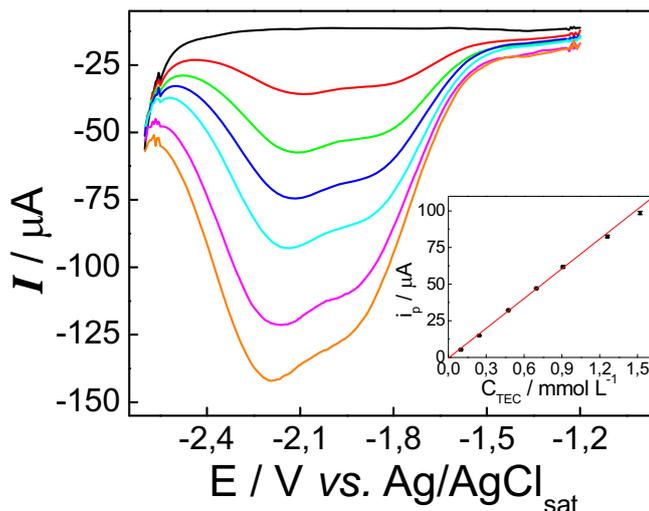


Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de TEC. (—) 0,0; (—) 0,25; (—) 0,50; (—) 0,75; (—) 1,0; (—) 1,25; (—) 1,5 mmol L⁻¹ de TEC. Condições voltamétricas: $\Delta E = 75$ mV, $f = 100$ Hz, $\Delta E_s = 5,0$ mV. Curva analítica inserida.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros analíticos obtidos para as diferentes técnicas voltamétricas estudadas.

Tabela 7 - Parâmetros analíticos para a determinação de TEC utilizando LSV, DPV e SWV.

Técnica	Equação da reta, $i_p / \mu\text{A}$ e $C_{\text{TEC}} / \text{mol L}^{-1}$	L.R.* $/ \text{mmol L}^{-1}$	S $/ \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$	LD $/ \text{mol L}^{-1}$	Detectabilidade $/ \text{mol L}^{-1}$
LSV	$i_p = -0,19 + 1,8 \times 10^4 C_{\text{TEC}}$ $R = 0,9997$	0,25 - 3,0	$1,8 \times 10^4$	$8,0 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$
DPV	$i_p = -0,36 + 2,1 \times 10^4 C_{\text{TEC}}$ $R = 0,9988$	0,1 - 1,8	$2,1 \times 10^4$	$4,2 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
SWV	$i_p = -0,04 + 6,8 \times 10^4 C_{\text{TEC}}$ $R = 0,9998$	0,1 - 1,5	$6,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$

*L.R - Intervalo linear.

A Tabela 7 mostra que todas as técnicas voltamétricas apresentaram intervalos lineares superiores a uma década de concentração. Os valores de S obtidos foram relativamente altos para todas as técnicas voltamétricas investigadas. Estes resultados sugerem que estas técnicas

apresentam grande potencialidade analítica para serem empregadas na determinação do TEC em formulações farmacêuticas. Ao contrário do observado para o FD, verificou-se que para o TEC a detectabilidade observada para todas as técnicas voltamétricas avaliadas encontra-se abaixo do primeiro ponto da curva analítica. Neste caso, a detectabilidade corresponde à menor concentração cujo sinal difere do branco, porém sem a definição de um pico voltamétrico que permita uma determinação confiável dos valores de i_p . Os pontos das curvas analíticas são referentes a valores médios de três medidas, em todos os casos, foram obtidos valores de RSD menores do que 2,5 %, indicando que as técnicas voltamétricas apresentam uma repetitividade adequada.

Os valores de LD encontrados foram da mesma ordem de grandeza, independentemente da técnica utilizada, o que pode ser atribuído à irreversibilidade da redução eletroquímica do TEC. Para sistemas totalmente irreversíveis, o desempenho analítico da técnica de SWV é apenas ligeiramente superior ao apresentado pela técnica de DPV e é devido unicamente às maiores velocidades de varredura permitidas pela técnica de SWV. Apesar do relativo sucesso das técnicas voltamétricas para a quantificação do TEC, verifica-se que os valores de LD obtidos são relativamente altos. Verifica-se que os limites de quantificação ($3,3 \times LD$) são próximos a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para todas as técnicas voltamétricas investigadas. O desempenho analítico relativamente modesto das técnicas voltamétricas pode ser atribuído ao fato de o TEC apresentar dois picos voltamétricos muito próximos e largos, o que prejudica o seu perfil voltamétrico. Este efeito é mais pronunciado em baixas concentrações, dificultando a aplicação das técnicas voltamétricas para a quantificação deste fármaco.

Uma alternativa interessante para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos é a utilização da detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas. O emprego de condições hidrodinâmicas apresenta a vantagem de intensificar o transporte de massa do analito para a superfície do eletrodo devido à convecção forçada, conseqüentemente, obtém-se um acentuado incremento na resposta de corrente em relação à corrente obtida em condições estáticas. Do ponto de vista analítico, o incremento de corrente em condições hidrodinâmicas implica uma maior sensibilidade. Outra vantagem estritamente analítica apresentada pela detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas é o menor tempo de análise, uma vez que não é necessário registrar um voltamograma completo. Esta vantagem se torna mais evidente considerando, por exemplo, a técnica de DPV, na qual baixas velocidades de

varredura devem ser empregadas. Assim, as vantagens analíticas inerentes à detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas, têm permitido o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a quantificação de diferentes fármacos em formulações farmacêuticas [72 - 75].

Previamente à utilização analítica da detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas, os parâmetros operacionais foram otimizados, isto foi realizado por meio da técnica de voltametria de varredura linear em condições hidrodinâmicas, empregando um eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo. A Figura 48 apresenta os voltamogramas de varredura linear registrados na ausência e na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em condições estáticas e hidrodinâmicas com velocidade de rotação do eletrodo (ω) de 500 rpm.

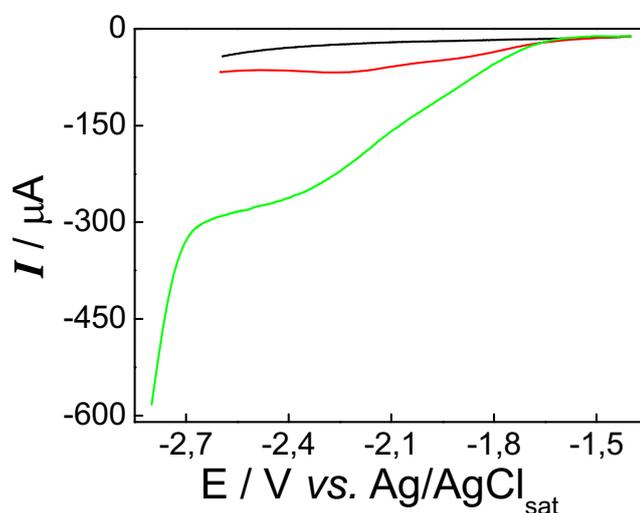


Figura 48 - Voltamogramas de varredura linear registrados em ACN/TBABF_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (—) ausência de TEC em condições estáticas, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (—) presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em condições estáticas, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (—) presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em condições hidrodinâmicas, $\omega = 500 \text{ rpm}$ e $v = 2,0 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 48 mostra que, em condições hidrodinâmicas com $\omega = 500 \text{ rpm}$, a corrente obtida é cerca de quatro vezes maior do que a obtida em condições estáticas. Este resultado evidencia que a detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas pode ser empregada na quantificação de TEC fornecendo maior sensibilidade do que a técnica de voltametria de varredura linear em condições estáticas. Na Figura 48 verifica-se também que um patamar de corrente é obtido a partir de $-2,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, indicando que, a partir deste valor de

potencial, um máximo de sinal de corrente é obtido, portanto, o potencial de $-2,3$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ foi adotado para as aplicações analíticas.

Foram registrados voltamogramas de varredura linear na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em diferentes valores de ω com a finalidade de se otimizar este parâmetro para as posteriores aplicações analíticas. Os voltamogramas obtidos nestas condições são apresentados na Figura 49.

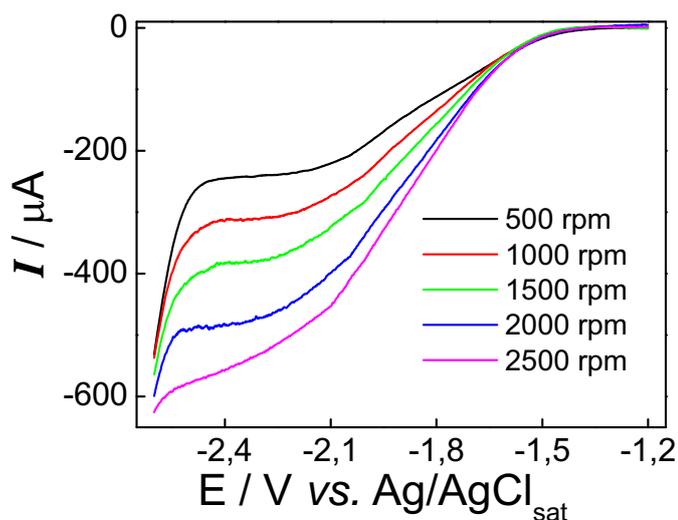


Figura 49 - Voltamogramas de varredura linear registrados em $\text{ACN}/\text{TBABF}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEC em diferentes valores de ω ; $v = 2,0 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir dos valores de corrente limite (i_L) obtidos dos voltamogramas apresentados na Figura 49, foi construído um gráfico de Levich (i_L vs. $\omega^{1/2}$), o qual é apresentado na Figura 50. Os valores de i_L foram amostrados em $-2,3$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$.

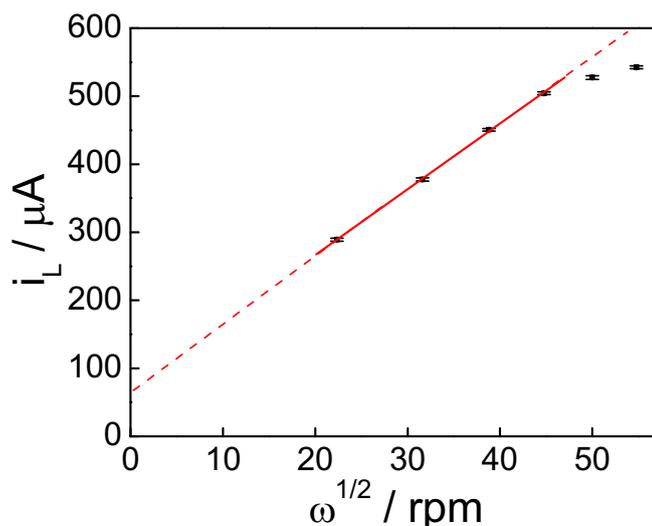


Figura 50 - Gráfico de Levich obtido a partir dos voltamogramas apresentados na Figura 49.

O gráfico de Levich mostrou-se linear no intervalo de 500 a 2000 rpm, segundo a equação: $i_L (\mu\text{A}) = 73,2 + 9,7 \omega^{1/2} (\text{rpm}^{1/2})$, com coeficiente de correlação igual a 0,9987. A partir de 2000 rpm observa-se um desvio negativo da linearidade. Este comportamento evidencia a presença de uma limitação cinética associada ao processo eletrodico [61]. Assim, em altas rotações, a intensificação do transporte de massa não é capaz de promover um aumento de i_L na mesma magnitude prevista pela equação de Levich, pois, nestas condições, o sistema passa a ser limitado pela cinética do processo eletrodico [61]. Este resultado é concordante com a irreversibilidade da redução eletroquímica do TEC constatada nos estudos voltamétricos. Observa-se também que o gráfico de Levich apresentado na Figura 50 apresenta um coeficiente linear significativamente diferente de zero, o que pode ser atribuído ao fato de os patamares obtidos serem, na realidade, uma somatória de dois processos eletrodicos distintos. Para os estudos analíticos, foi adotada a rotação de 2000 rpm, uma vez que, como mostra a Figura 50, rotações maiores não fornecem um aumento significativo na corrente.

Assim, após a otimização dos parâmetros operacionais ($E = -2,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, $\omega = 2000 \text{ rpm}$), registrou-se um amperograma, no qual foram realizadas sucessivas adições de TEC visando a construção de uma curva analítica. O amperograma mostrando as sucessivas adições de TEC juntamente com a respectiva curva analítica é apresentado na Figura 51.

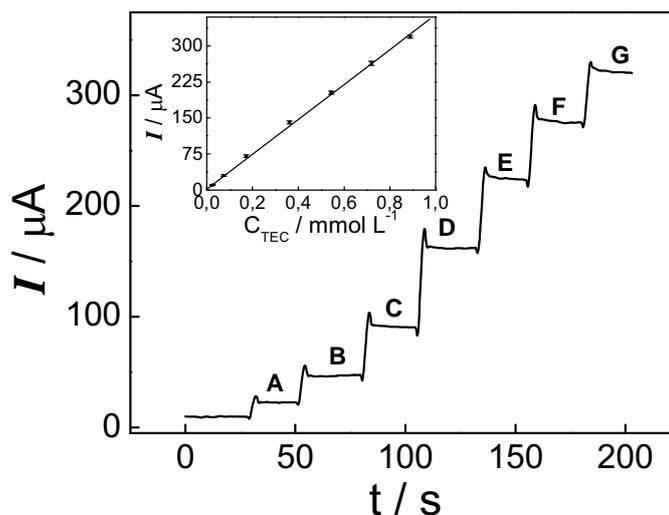


Figura 51 - Amperograma registrado em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹; E = -2,3 V vs. Ag/AgCl_{sat}, ω = 2000 rpm. (A) $2,5 \times 10^{-5}$; (B) $7,5 \times 10^{-5}$, (C) $1,7 \times 10^{-4}$, (D) $3,6 \times 10^{-4}$, (E) $5,4 \times 10^{-4}$; (C) $7,2 \times 10^{-4}$, (D) $8,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de TEC.

Para a construção da curva analítica, as correntes foram amostradas sempre 10 s após a formação de cada patamar. Verificou-se uma relação linear entre I e a concentração de TEC no intervalo de $1,0 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, segundo a equação: I (μA) = $0,71 + 3,63 \times 10^5 C_{\text{TEC}}$ (mol L⁻¹) com coeficiente de correlação linear de 0,9995. O valor de LD obtido foi $8,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com S igual a $3,63 \times 10^5 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$. A detectabilidade obtida para a detecção amperométrica do TEC foi de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, uma vez que menores concentrações não forneceram qualquer resposta de corrente. Uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com a detecção amperométrica do TEC e com as técnicas voltamétricas (Tabela 7) mostra que o início do intervalo de linearidade obtido com a detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas encontra-se em uma concentração que é aproximadamente dez vezes menor do que a observada para as técnicas voltamétricas. Verifica-se também que a sensibilidade obtida com a detecção amperométrica é cerca de dez vezes maior do que as obtidas com as técnicas de LSV e DPV; quando comparada com a técnica de SWV o aumento da sensibilidade é de aproximadamente cinco vezes. Assim, constata-se que a detecção amperométrica foi mais sensível até mesmo do que a SWV, a mais sensível das técnicas voltamétricas. Em termos de LD, a detecção amperométrica forneceu um valor aproximadamente dez vezes menor do que o obtido com a técnica de LSV e ligeiramente menor do que o obtido com a SWV. Além de fornecer melhores parâmetros analíticos do que os obtidos com as técnicas voltamétricas, a detecção

amperométrica apresenta a vantagem de requerer um menor tempo de análise. Assim, a comparação entre o desempenho analítico das técnicas voltamétricas e da detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas, sugere que esta última seja mais apropriada para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a quantificação do TEC.

Apesar desta observação, tanto as técnicas voltamétricas quanto a detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas foram empregadas para a quantificação do TEC em uma formulação farmacêutica comercial, cujo teor nominal do fármaco é de 500 mg por comprimido. Para a determinação de TEC na formulação farmacêutica, cinco comprimidos foram macerados, sendo o sólido resultante dissolvido em ACN e submetido à análise empregando-se o método de adição de padrão. A massa média dos comprimidos foi determinada, sendo obtido o valor de 0,59187 g. Para a determinação de TEC pela técnica de LSV uma massa de 0,0297 g do sólido resultante foi dissolvida em 50 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, conduzindo a uma concentração nominal de TEC de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Alíquotas de 10 mL desta solução foram transferidas para a célula eletroquímica e submetidas a análise pelo método de adição de padrão. Para a determinação de TEC pelas técnicas de DPV e SWV uma massa de 0,0297 g do sólido obtido pela maceração dos comprimidos foi dissolvida em 100 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, conduzindo a uma concentração nominal de TEC de 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Alíquotas de 10 mL desta solução foram transferidas para a célula eletroquímica e submetidas à análise pelo método de adição de padrão. Para a determinação de TEC por meio de sua detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas, uma massa de aproximadamente 0,0120 g do sólido resultante foi dissolvida em 1,0 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, conduzindo a uma concentração nominal de TEC de aproximadamente 2,0 x 10⁻² mol L⁻¹. Alíquotas de 200 µL desta solução foram adicionadas à célula eletroquímica contendo 20 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ e submetidas à análise pelo método de adição de padrão. As curvas voltamétricas relativas à amostra e as sucessivas adições de padrão, juntamente com as curvas de adição de padrão obtidas pelas técnicas de LSV, DPV e SWV são apresentadas, respectivamente, nas Figuras 52, 53 e 54.

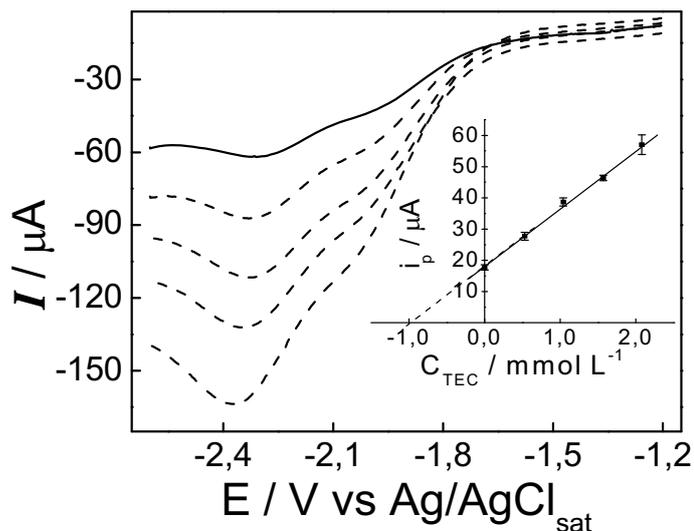


Figura 52 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 50 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Curva de adição de padrão inserida.

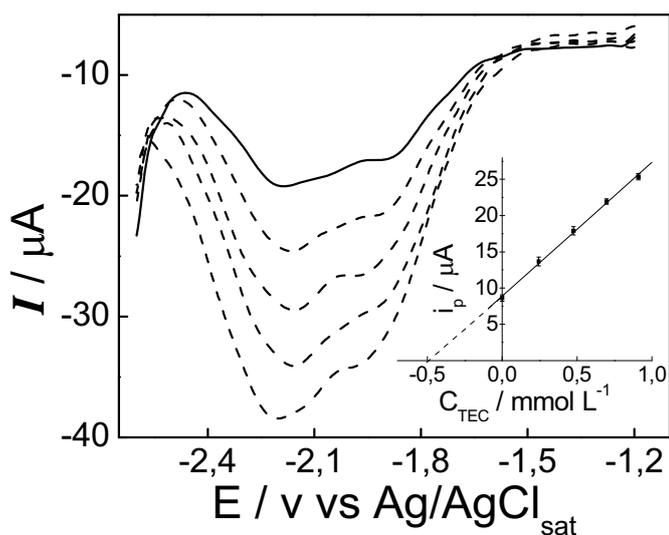


Figura 53 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 25 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições voltamétricas: $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Curva de adição de padrão inserida.

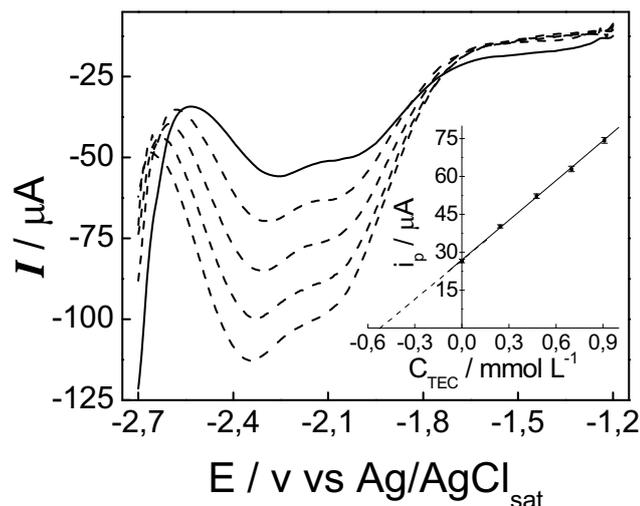


Figura 54 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 25 μL de uma solução padrão de TEC 100 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições voltamétricas: $\Delta E = 75$ mV, $f = 100$ Hz, $\Delta E_s = 5,0$ mV. Curva de adição de padrão inserida.

O amperograma mostrando a resposta da amostra e das sucessivas adições de padrão é apresentado na Figura 55.

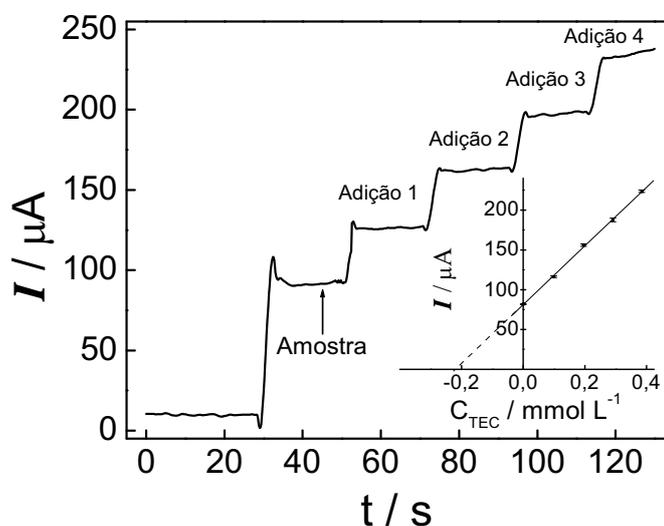


Figura 55 - Amperograma registrado em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ mostrando a resposta amperométrica da amostra comercial e das sucessivas adições de 100 μL de um padrão de TEC 20 mmol L⁻¹ a 20 mL de solução. $E = -2,3$ V vs. Ag/AgCl_{sat}, $\omega = 200$ rpm. Curva de adição de padrão inserida.

Foi verificado que os voltamogramas registrados na presença da amostra comercial apresentaram perfil idêntico aos registrados em presença do TEC puro para todas as técnicas

voltamétricas investigadas. Este resultado indica que os excipientes presentes na formulação farmacêutica não interferem na determinação voltamétrica do TEC, mostrando que estas técnicas podem ser empregadas com êxito na determinação deste fármaco em formulações farmacêuticas. Tanto para as técnicas voltamétricas quanto para a amperométrica, foi observado que as inclinações das curvas de adição de padrão foram muito próximas às inclinações da curva analítica. Este resultado confirma que a amostra comercial da formulação farmacêutica é isenta de efeitos de matriz, estando a curva de adição de padrão simplesmente deslocada no eixo y em relação à curva analítica. Nesta situação, a simples interpolação do ponto da amostra na curva analítica forneceria o exato valor de concentração, não sendo necessária a utilização do método de adição de padrão. Entretanto, a concordância entre as inclinações das curvas analíticas e de adição de padrão fornece uma prova importante da ausência de efeitos de matriz. Para todas as curvas de adição de padrão, os pontos equivalem ao valor médio de cinco determinações. Os valores de RSD obtidos para cada ponto foram sempre menores do que 5,0 %, indicando uma boa repetitividade dos métodos eletroanalíticos desenvolvidos. Os resultados da determinação do TEC na amostra comercial pelos diferentes métodos analíticos desenvolvidos são apresentados na Tabela 8. O valor de corrente relativo à primeira adição do padrão do fármaco foi empregado para determinar a porcentagem de recuperação do TEC na formulação farmacêutica, sendo as porcentagens de recuperação também apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da determinação de TEC na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos.

Técnica	Encontrado ^b mg / comprimido	Adicionado / mol L ⁻¹	Recuperado / mol L ⁻¹	t ^c	Recuperação / %
LSV	502 ± 8	5,00 x 10 ⁻⁴	(5,02 ± 0,13) x 10 ⁻⁴	0,34	100 ± 4
DPV	496 ± 11	2,50 x 10 ⁻⁴	(2,56 ± 0,11) x 10 ⁻⁴	1,2	102 ± 3
SWV	516 ± 15	2,50 x 10 ⁻⁴	(2,51 ± 0,10) x 10 ⁻⁴	0,22	100 ± 4
D.A ^a	518 ± 16	1,00 x 10 ⁻⁴	(0,99 ± 0,05) x 10 ⁻⁴	0,45	99 ± 5

^a Detecção Amperométrica. ^bMédia de cinco determinações. ^ct_{crítico} = 2,78 (P = 0,05, 4 graus de liberdade) [76]. Teste-t corresponde à comparação estatística entre os valores adicionados vs. recuperados.

Os valores de t foram calculados para o caso de comparação entre uma média experimental e um valor conhecido, sendo este correspondente à concentração nominal da primeira adição de padrão. Nesta situação o valor de t é calculado de acordo com a seguinte equação [76]:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s} \quad (3)$$

Onde: \bar{x} representa o valor médio determinado experimentalmente; μ representa o valor conhecido; n é o número de replicadas e s corresponde ao desvio padrão obtido.

A Tabela 8, mostra que os teores de TEC determinados foram muito próximos ao nominal para todos os métodos eletroanalíticos desenvolvidos. Assim, os resultados da determinação do TEC na amostra comercial, indicam que esta se encontra dentro das especificações em relação ao teor do princípio ativo. Para todos os métodos eletroanalíticos foram encontradas porcentagens de recuperação próximas a 100 %, confirmando a validade dos métodos desenvolvidos para a determinação do TEC nesta amostra comercial. Os desvios padrão relativos dos valores recuperados variaram entre 2,6 e 5,0 % para os diferentes métodos desenvolvidos, indicando que a repetitividade dos métodos desenvolvidos é adequada. Os valores de t correspondentes à comparação estatística entre o teor adicionado e o recuperado não excederam o valor crítico para nenhuma das técnicas estudadas, indicando que não existem diferenças estatísticas entre os teores adicionados e recuperados. O fato do valor de t ser sempre menor do que o valor crítico mostra também que não são encontradas evidências da presença de erros sistemáticos nos resultados obtidos pelos métodos eletroanalíticos desenvolvidos. Apesar das menores sensibilidades apresentadas pelas técnicas voltamétricas em relação ao método amperométrico, o elevado teor de analito na amostra permitiu que tanto as técnicas voltamétricas quanto o método amperométrico pudessem ser empregados com sucesso para a quantificação do TEC nesta formulação farmacêutica. Entretanto é importante ressaltar que apesar das vantagens da detecção amperométrica em condições hidrodinâmicas em termos de sensibilidade e tempo de análise, esta técnica apresenta grandes limitações quanto à seletividade, principalmente quando potenciais muito negativos ou positivos são utilizados na detecção. Entretanto, em virtude da formulação farmacêutica ser uma amostra relativamente simples, não apresentando outros componentes eletroativos, a detecção amperométrica pôde ser empregada com sucesso para a quantificação

do TEC nesta amostra. Assim, os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que todos os métodos eletroanalíticos desenvolvidos podem ser empregados com êxito na quantificação de TEC nesta amostra comercial, permitindo a determinação de maneira rápida, simples e com custo instrumental relativamente baixo.

4.3 - Etofamida (ET)

A exemplo das outras duas dicloroacetamidas estudadas, a redução eletroquímica da ET foi estudada em ACN. Adicionalmente, a redução eletroquímica deste fármaco foi estudada também em meio misto, utilizando a mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v).

4.3a - Estudo da redução eletroquímica da ET em meio de ACN

4.3a.1 - Experimentos voltamétricos

Para o estudo da redução eletroquímica da ET sobre carbono vítreo em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, foram registrados voltamogramas cíclicos no intervalo de 0,0 V a -2,8 V *vs.* Ag/AgCl_{sat}, potencial no qual se observa o início do processo de descarga do sistema solvente/eletrólito. A Figura 56 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados na ausência e na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET no intervalo de potencial de 0 a -2,6 V *vs.* Ag/AgCl_{sat}, intervalo no qual são observados os picos voltamétricos relativos à ET.

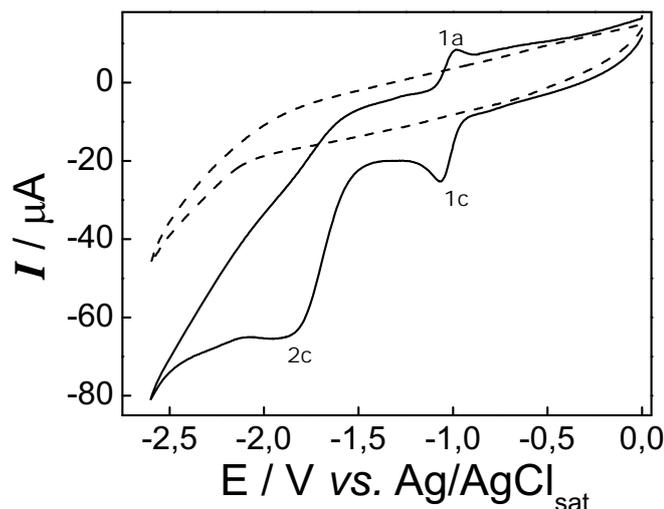


Figura 56 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (---) Ausência de ET. (—) Presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET.

A Figura 56 mostra que a redução eletroquímica da ET envolve dois processos eletródicos. O primeiro origina um par de picos reversível (picos 1c e 1a), cujo E_{pc} encontra-se em $-1,0$ V vs. Ag/AgCl_{sat}, enquanto o segundo processo origina um pico catódico (pico 2c) em $-1,8$ V vs. Ag/AgCl_{sat}, sem o correspondente pico anódico na varredura reversa.

De acordo com a literatura [49], em meio aprótico, a redução eletroquímica do grupo nitro envolve a transferência reversível de um elétron gerando o ânion-radical R-NO₂^{•-}, o qual é estável em meio aprótico. Assim, o par de picos 1c e 1a pode ser atribuído à redução do grupo nitro ao ânion-radical e à reoxidação deste ao grupo nitro. Alguns trabalhos têm mostrado a possibilidade de que, em meio aprótico, o ânion-radical receba um segundo elétron em uma transferência eletrônica também reversível, formando o correspondente diânion R-NO₂²⁻ [49,58]. Segundo estes trabalhos, na presença de impurezas eletrofílicas, o pico voltamétrico correspondente à formação do diânion assume o perfil de um pico voltamétrico associado a um processo irreversível, em virtude de o diânion sofrer um ataque eletrofílico das impurezas do meio reacional. Alguns pesquisadores têm mostrado que a redução eletroquímica do metronidazol em meio misto origina dois picos voltamétricos, um de caráter reversível, correspondendo à formação do ânion-radical e outro, de caráter irreversível, correspondendo à redução do ânion-radical a hidroxilamina (-NHOH) [52]. Assim, existe a possibilidade de que tanto o par de picos 1c e 1a quanto o pico 2c estejam associados à redução eletroquímica do grupo nitro. Visando verificar esta hipótese, foram registrados voltamogramas cíclicos com interrupção da varredura em valores de potencial e

tempo pré-definidos. Os voltamogramas cíclicos registrados nestas condições são apresentados na Figura 57.

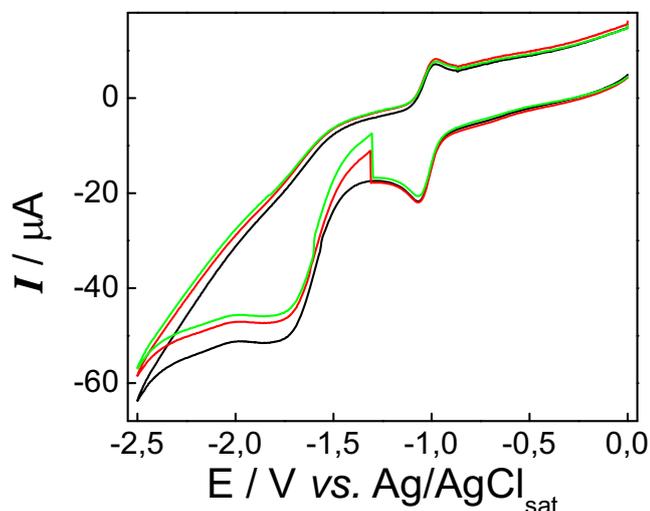


Figura 57 - Voltamogramas cíclicos registrados em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET. (—) Sem interrupção da varredura. (—) Interrupção por 5 s. (—) Interrupção por 20 s.

A interrupção da varredura em um potencial imediatamente após o potencial no qual se observa um processo redox, causa um aumento da concentração do produto deste processo na região da interface eletrodo/solução desde que a varredura seja interrompida por intervalos de tempo relativamente curtos evitando perdas por difusão. Assim, a interrupção da varredura permite verificar se dois processos redox consecutivos são ou não interdependentes. Caso o processo ocorrendo em potenciais mais elevados esteja relacionado com a redução ou a oxidação do produto eletrogerado no primeiro processo, a interrupção da varredura promoverá um significativo aumento da corrente observada para o segundo processo. A Figura 57 mostra que a interrupção da varredura após o pico 1c não causa alterações significativas nas correntes observadas para o pico 2c, indicando que os dois processos não são interdependentes. Este resultado indica que, nas condições experimentais adotadas, não é observada a formação do diânion (R-NO₂⁻) ou a redução do grupo nitro a hidroxilamina. O fato de não haver dependência entre o pico 1c e o pico 2c indica que este último está associado à redução eletroquímica de outro grupo funcional da molécula da ET e não ao grupo nitro. Em virtude da similaridade do pico 2c com os picos voltamétricos associados à redução eletroquímica das

outras duas dicloroacetamidas estudadas, é muito provável que este pico seja relativo à quebra redutiva de ligações C-Cl.

Visando obter informações adicionais sobre a redução eletroquímica da ET, cada um dos processos eletródicos associados a este fármaco foi estudado individualmente. A Figura 58 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em diferentes valores de v , sendo o intervalo de potencial restrito à região na qual é observado o par de picos 1c e 1a.

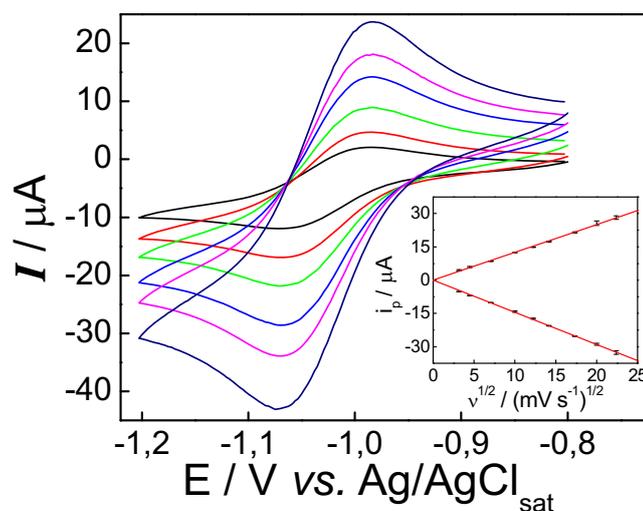


Figura 58 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBAPF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em diferentes valores de v . (—) 20; (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 500 mV s^{-1} . Inseto: gráfico i_p vs. $v^{1/2}$.

A partir dos valores de i_p obtidos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 58, foram construídos gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ tanto para o processo catódico quanto para o anódico. Verificou-se que estes gráficos apresentaram um comportamento linear para ambos os processos, indicando que os mesmos apresentam um controle difusional. Para o pico catódico verificou-se uma linearidade segundo a equação: $i_{pc} (\mu\text{A}) = -1,4 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$, com coeficiente de correlação linear igual a $-0,9995$. Para pico anódico, a linearidade entre i_{pa} e $v^{1/2}$ obedece a seguinte equação: $i_{pa} (\mu\text{A}) = 1,2 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$, com coeficiente de correlação linear igual a $0,9988$. A Tabela 9 apresenta alguns parâmetros voltamétricos obtidos em diferentes velocidades de varredura para o par de picos 1c e 1a.

Tabela 9 - Parâmetros voltamétricos obtidos para o par de picos 1c e 1a, referentes à redução eletroquímica de 1,0 mmol L⁻¹ de ET em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

ν (mV s ⁻¹)	-E _{pc} (V)	E _{pc} - E _{pa} (mV)	i _{pa} /i _{pc}	i _{pc} /ν ^{1/2} (μA/(mV s ⁻¹) ^{1/2})
10	1,06	61	1,02	1,43
20	1,06	64	1,08	1,44
50	1,06	61	1,05	1,43
100	1,06	61	1,01	1,42
150	1,06	62	1,03	1,41
200	1,06	65	1,05	1,45
300	1,06	65	0,98	1,46
400	1,07	78	0,95	1,44
500	1,07	78	0,89	1,46

A Tabela 9 mostra o comportamento reversível do processo redox estudado. Verifica-se que os valores de E_p não sofrem variações significativas com o aumento de ν. O fato da razão i_{pa}/i_{pc} ser sempre próxima a 1,0 independentemente da velocidade de varredura, bem como a função corrente (i_{pc}/ν^{1/2}) ser independente de ν, indica que o processo eletródico não é acompanhado por reações químicas acopladas [60,61]. Os valores obtidos para a diferença entre o potencial de pico catódico e o potencial de pico anódico (ΔE_p) foram próximos a 59 mV, se afastando deste valor somente para as duas maiores velocidades de varredura empregadas. Os valores obtidos para ΔE_p são típicos de uma transferência eletrônica reversível envolvendo a transferência de apenas um elétron [60,61]. Assim, os resultados apresentados na Tabela 9 são concordantes com o esperado para a redução eletroquímica do grupo nitro ao correspondente ânion-radical. Os valores da razão i_{pa}/i_{pc} mostrados na Tabela 9 foram determinados segundo o método proposto por Nicholson [61], o qual utiliza a seguinte equação:

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = \frac{(i_{pa})_0}{i_{pc}} + \frac{0,485(i_{sp})_0}{i_{pc}} + 0,086$$

Onde: $(i_{pa})_0$ corresponde a corrente anódica com relação ao zero (não corrigida) e $(i_{sp})_0$ corresponde a corrente em relação ao zero no potencial de inversão da varredura.

A Tabela 9 apresentou evidências de que o processo eletródico estudado (picos 1c e 1a) não é acompanhado por reações químicas acopladas. Visando a obtenção de mais dados experimentais que pudessem suportar esta observação, avaliou-se o comportamento do par de picos 1c e 1a frente a sucessivas varreduras de potencial, sendo os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo apresentados na Figura 59.

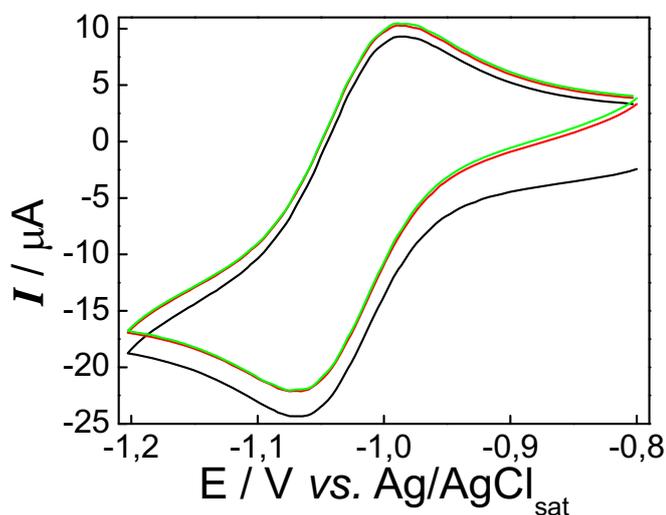


Figura 59 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET. (—) Primeiro ciclo. (—) Segundo ciclo. (—) Terceiro ciclo.

A Figura 59 mostra uma diminuição inferior a 5,0 % nos valores de corrente do primeiro para o segundo ciclo. Este comportamento é típico de processos controlados por difusão sem componentes cinéticas ou processos adsortivos. Caso tais processos estivessem presentes, seria observada uma queda significativamente maior nos valores de corrente do primeiro para o segundo ciclo. Assim, os experimentos envolvendo sucessivas varreduras de potencial forneceram resultados concordantes com aqueles apresentados na Tabela 9, confirmando a ausência de processos adsortivos ou reações químicas acopladas à transferência eletrônica.

A seqüência reacional apresentada no Esquema 10 mostra que várias etapas de protonação estão envolvidas na redução eletroquímica do grupo nitro em meio prótico. Assim, o comportamento voltamétrico da ET foi estudado na presença de ácido acético (HAc), o qual atua como doador de prótons, sendo, portanto, capaz de promover as etapas de protonação apresentadas no Esquema 10. A Figura 60 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em diferentes concentrações de HAc.

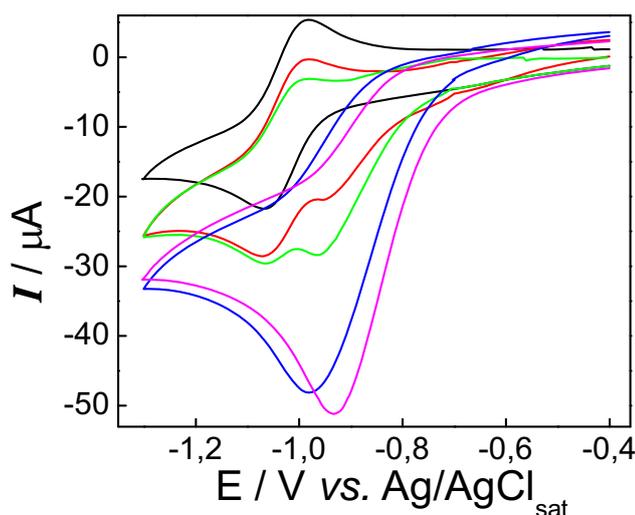


Figura 60 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 1,0 (—) 5,0; (—) 10 mmol L^{-1} de HAc.

A Figura 60 mostra que a presença de $0,5$ ou $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAc provoca um desdobramento do pico catódico, sendo observada a formação de um pré-pico em potenciais mais positivos que o observado para o pico original. Verifica-se também uma queda nos valores de i_{pa} com o aumento da concentração de HAc. Para concentrações de HAc maiores do que $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, observa-se o completo desaparecimento do pico anódico e a fusão dos picos desdobrados em um novo pico catódico de maior intensidade, o qual sistematicamente desloca-se para potenciais mais positivos com o aumento da concentração de HAc. O desaparecimento do pico anódico (1a) para concentrações de HAc superiores a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ deve-se às sucessivas reações de protonação acopladas às transferências eletrônicas, as quais consomem rapidamente o ânion-radical, evitando sua reoxidação na varredura reversa. O desdobramento observado na Figura 60 para as menores concentrações de HAc tem sido observado na literatura para a redução eletroquímica de compostos nitroaromáticos [49,77]. Este comportamento tem sido atribuído a uma reação de pré-protonação do grupo nitro.

Assim, o pré-pico estaria associado à redução eletroquímica do grupo nitro protonado e o pico principal seria referente à redução eletroquímica do grupo nitro livre. Na presença de maiores concentrações do doador de prótons, o grupo nitro estaria praticamente todo na forma protonada, originando um único pico voltamétrico relativo à redução desta espécie a hidroxilamina. Este último processo envolve a transferência de quatro elétrons, o que é responsável pelo aumento da intensidade do pico voltamétrico em relação ao observado na ausência do doador de prótons.

A Figura 60 mostra que tanto E_p e quanto i_p do pico 1a sofrem variações com a concentração de HAc, sendo observada uma dependência linear entre E_p e o logaritmo da concentração de HAc segundo a equação: E_p (V) = 0,75 - 0,091 log C_{HAc} (mol L⁻¹), com coeficiente de correlação linear igual a -0,9931. Este comportamento confirma a existência de etapas de protonação acopladas às etapas eletroquímicas, o que é concordante com a seqüência reacional apresentada no Esquema 10. A variação de i_p em função da concentração de HAc é apresentada na Figura 61.

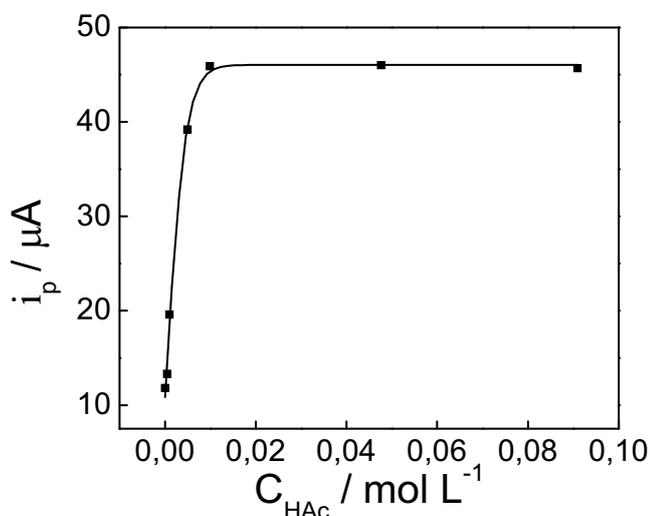


Figura 61 - Variação de i_p em função da concentração de HAc.

A Figura 61 mostra um aumento acentuado de i_p com a concentração de HAc até 0,01 mol L⁻¹, a partir desta concentração, verifica-se que os valores de i_p permanecem praticamente constantes. Assim, constata-se que 0,01 mol L⁻¹ de HAc é suficiente para promover todas as etapas de protonação envolvidas no processo eletródico, portanto, um

aumento na concentração do doador de prótons não causa um aumento no número de elétrons, conseqüentemente, a corrente permanece praticamente constante.

De acordo com a literatura [56-58], o grupo hidroxilamina proveniente da redução do grupo nitro em meio prótico pode ser oxidado ao grupo nitroso em um processo reversível envolvendo a transferência de dois elétrons (Esquema 11). A Figura 62 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em presença de 2,0 mmol L⁻¹ de ET, na ausência e na presença de HAc. Nestes voltamogramas cíclicos o limite anódico foi estendido a valores suficientemente positivos para que a oxidação da hidroxilamina pudesse ser visualizada.

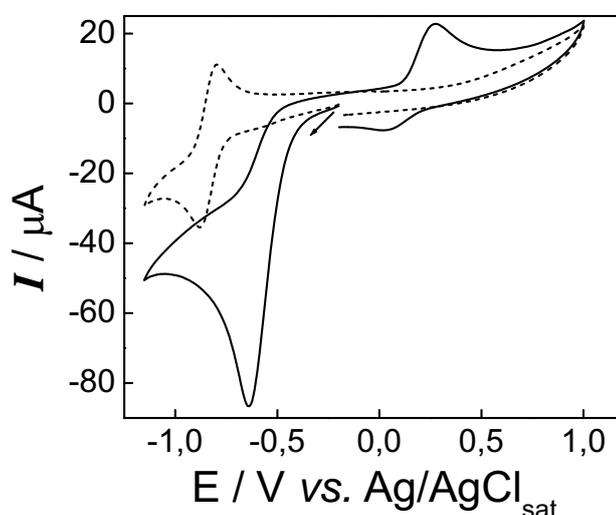


Figura 62 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 2,0 mmol L⁻¹ de ET, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Ausência de HAc. (—) Presença de 0,1 mol L⁻¹ de HAc.

A Figura 62 mostra que o voltamograma cíclico registrado em presença de ET sem a adição de HAc apresenta somente o par de picos relativo ao grupo nitro. A adição de HAc causa um aumento do pico catódico referente à redução do grupo nitro e o desaparecimento do pico anódico na varredura reversa, conforme discutido anteriormente. Além disso, na presença do doador de prótons observou-se o aparecimento de um novo par de picos, cujo E_{pa} é igual a +0,35 V vs. Ag/AgCl_{sat}. Este resultado é concordante com a oxidação da hidroxilamina ao derivado nitroso, e mostra que, em presença de um doador de prótons, o grupo nitro é reduzido a hidroxilamina.

Desta forma, o conjunto de resultados obtidos tanto em meio aprótico quanto na presença de HAc confirma que o primeiro processo da redução eletroquímica da ET está, de fato, associado à redução do grupo nitro presente na molécula do fármaco.

Após o estudo do primeiro processo da redução eletroquímica da ET, o segundo pico catódico (pico 2c da Figura 56) foi estudado empregando-se a mesma metodologia adotada para o par de picos 1c e 1a. A Figura 63 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados na ausência e na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, sendo o intervalo de potencial limitado à região na qual se observa o pico 2c.

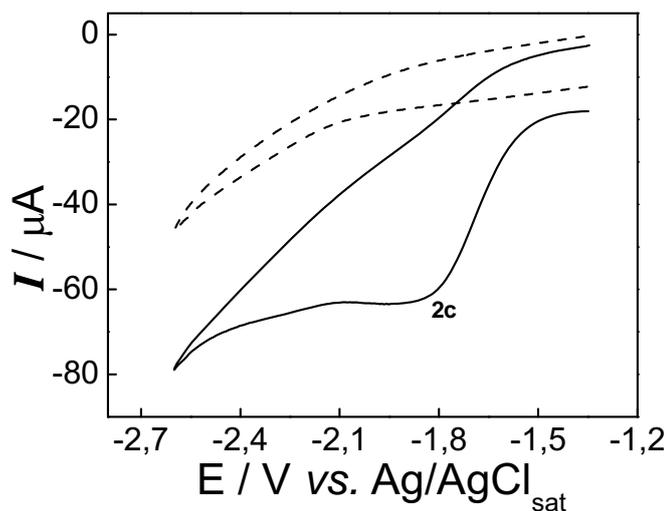


Figura 63 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} . (---) Ausência de ET. (—) Presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET.

Verifica-se que o pico catódico observado em presença de ET não apresenta o correspondente pico anódico na varredura reversa, indicando que este pico está relacionado a uma transferência eletrônica irreversível ou que o processo eletródico é seguido por reações químicas acopladas. Foi verificada uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$, segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 1,73 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9976, mostrando que o processo estudado é controlado por difusão. Os parâmetros voltamétricos obtidos para o pico 2c nas diferentes velocidades de varredura estudadas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros voltamétricos obtidos para o segundo pico voltamétrico relativo à redução da de 1,0 mmol L⁻¹ de ET em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

v (mV s ⁻¹)	i_p (μA)	$-E_p$ (V)	$i_p/v^{1/2}$ (μA/(mV s ⁻¹) ^{1/2})
20	8	1,82	1,68
50	12	1,85	1,68
100	18	1,88	1,68
150	22	1,91	1,70
200	25	1,92	1,74
300	27	1,92	1,72
400	29	1,93	1,69
500	34	1,94	1,72

A Tabela 10 mostra um deslocamento de E_p para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varredura. Observa-se também que a função corrente permanece praticamente constante independentemente da velocidade de varredura. Além disso, a ausência do correspondente pico anódico foi observada em todas as velocidades de varredura estudadas (10 a 500 mV s⁻¹) e também pela técnica de SWV. De acordo com as equações 1 e 2, para um processo totalmente irreversível, os gráficos de E_p vs. $\ln i_p$ e E_p vs. $\ln v$ devem ser lineares, sendo que seus coeficientes angulares fornecem o valor do produto αn_c . Foi verificado que ambos os gráficos apresentaram um comportamento linear, confirmando a irreversibilidade do segundo processo de redução eletroquímica da ET. Para o gráfico de E_p vs. $\ln i_p$ foi obtida a seguinte equação: E_p (V) = -2,76 - 0,080 $\ln [i_p$ (A)], com coeficiente de correlação linear igual a -0,9966. Para o gráfico de E_p vs. $\ln v$ a linearidade obedece a seguinte equação: E_p (V) = -1,98 - 0,041 $\ln [v$ (V s⁻¹)], com coeficiente de correlação linear igual a -0,9962. Verifica-se que o coeficiente angular do gráfico de E_p vs. $\ln i_p$ é o dobro do coeficiente angular do gráfico de E_p vs. $\ln v$, conforme previsto pelas equações 1 e 2. Os coeficientes angulares encontrados para estes gráficos correspondem a um produto $\alpha n_c = 0,32$. Assim como observado para o TEC, verifica-se que a redução eletroquímica da ET apresenta um valor de α significativamente menor do que 0,5. Este resultado é

concordante com uma transferência eletrônica seguida por quebra de ligação [39]. Desta forma, a similaridade do perfil e do valor de E_p do pico 2c com o observado para as outras dicloroacetamidas estudadas, sugere que este pico esteja relacionado à quebra redutiva das ligações C-Cl da molécula da ET.

Foram registrados voltamogramas cíclicos da ET em presença de um doador de prótons, estendendo-se o limite catódico, sendo estes voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 64.

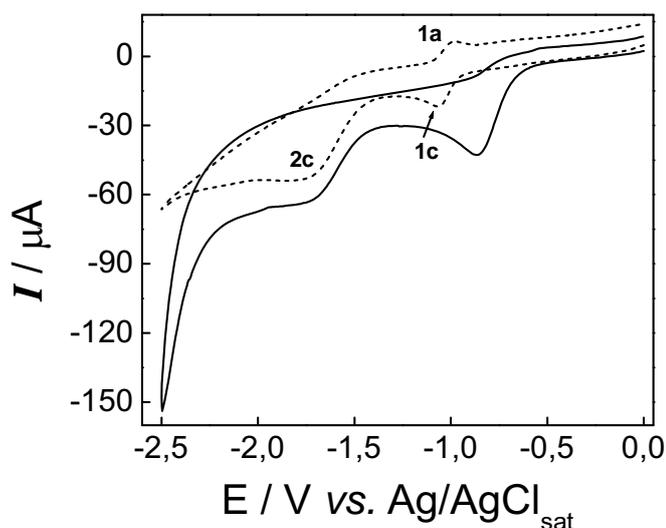


Figura 64 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBAPF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ET, $\nu = 100$ mV s⁻¹. (---) Ausência de HAc. (—) Presença de 0,1 mol L⁻¹ de HAc.

A Figura 64 mostra que o pico 2c não sofre qualquer alteração com a adição da espécie doadora de prótons, indicando que não ocorrem reações de protonação acopladas às etapas eletroquímicas. Este comportamento é concordante com o observado na literatura para a quebra redutiva de ligações C-X, processo que, segundo a literatura, não envolve etapas de protonação [71,78].

Assim, o fato do pico 2c ser um processo irreversível, independente do pico 1a e da presença de doador de prótons, aliado ao seu valor de E_p e ao fato de apresentar α significativamente menor do que 0,5 indica que este pico esteja associado à quebra redutiva de ligações C-Cl, assim como o observado para as outras duas dicloroacetamidas estudadas.

4.3a.2 - Eletrólises a potencial controlado

As eletrólises da ET foram realizadas em triplicata, sendo eletrolisados 15 mL de uma solução 2,0 mmol L⁻¹ do fármaco. Estas eletrólises foram realizadas aplicando-se -2,1 V vs. Ag/AgCl_{sat}, visando determinar o número total de elétrons transferidos na redução eletroquímica da ET. As curvas amperométricas relativas à estas eletrólises são apresentadas na Figura 65.

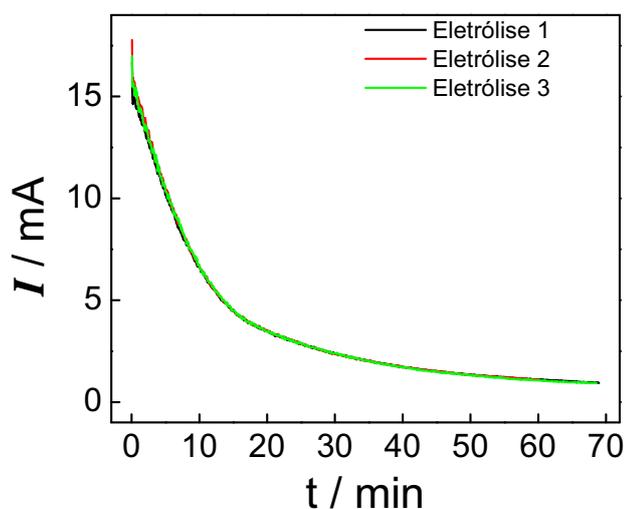


Figura 65 - Curvas amperométricas obtidas para a eletrólise de 2,0 mmol L⁻¹ de ET em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. E = -2,1 V vs. Ag/AgCl_{sat}. V_{eletrolisado} = 15 mL. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.

A integração das curvas amperométricas forneceu um valor médio de carga, já descontada a carga residual, igual a $14,3 \pm 0,3$; correspondendo a um número de elétrons transferidos por mol de fármaco igual a $4,9 \pm 0,2$. Este número de elétrons sugere a quebra redutiva das duas ligações C-Cl da ET, envolvendo quatro elétrons e a redução do grupo nitro gerando o ânion-radical envolvendo 1 elétron. Após estas eletrólises verificou-se o completo desaparecimento dos picos voltamétricos relativos à ET, conforme mostra a Figura 66.

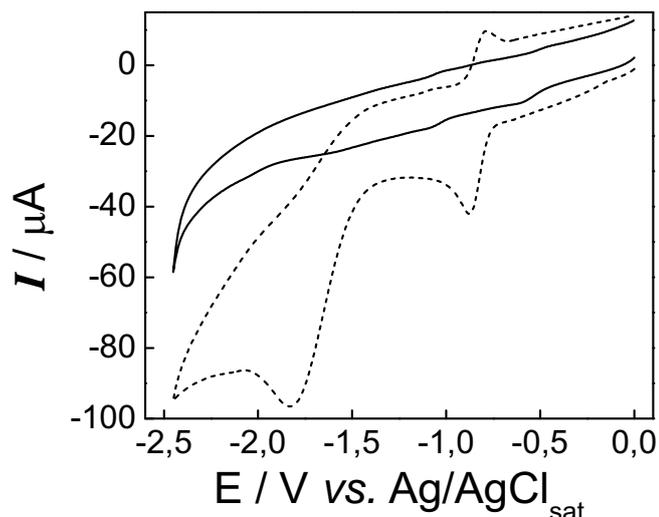


Figura 66 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

O voltamograma cíclico registrado após as eletrólises mostrou tanto o desaparecimento do pico atribuído à quebra redutiva das ligações C-Cl quanto do pico relativo ao grupo nitro. Este resultado demonstra que o ânion-radical R-NO_2^\bullet eletrogerado também é consumido durante as eletrólises, provavelmente via etapas químicas e não eletroquímicas.

Ao contrário do observado para as outras dicloroacetamidas, verificou-se que o voltamograma cíclico registrado no sentido anódico após as eletrólises da ET não apresenta o pico voltamétrico relativo à oxidação do cloreto, conforme mostra a Figura 67.

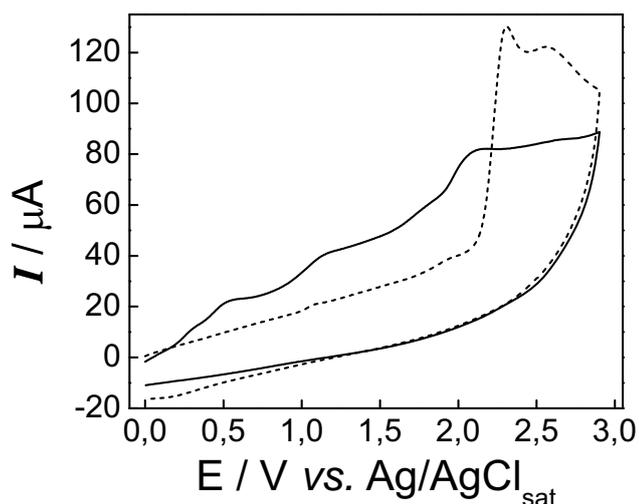


Figura 67 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

A ausência do pico voltamétrico relativo à oxidação do cloreto foi observada nas três eletrólises realizadas e, a princípio, sugere que a redução eletroquímica da ET não envolve quebra de ligações C-Cl. Entretanto, isto é pouco provável considerando os resultados obtidos nos estudos voltamétricos e a semelhança estrutural entre a ET e as outras dicloroacetamidas estudadas.

Foram realizadas eletrólises da ET em presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HAc. Estas eletrólises também foram realizadas em meio de ACN/TBABF₄, sendo eletrolisados 15 mL de uma solução $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET. A Figura 68 apresenta as curvas amperométricas referentes às eletrólises da ET em presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HAc, sendo estas eletrólises realizadas aplicando-se $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, potencial ligeiramente mais negativo do que o E_p do primeiro processo relativo a redução eletroquímica da ET.

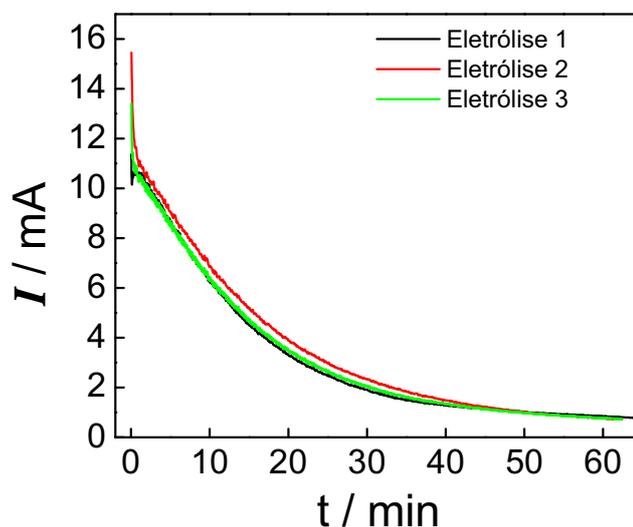


Figura 68 - Curvas amperométricas relativas às eletrólises de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em meio de ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HAc. $E = -1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. $V_{\text{eletrolisado}} = 15 \text{ mL}$. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com $2 \times 2 \text{ cm}$.

Após subtrair a carga residual, o valor médio de carga referente à eletrólise da ET foi de $11,9 \pm 1,0$, correspondendo a $4,1 \pm 0,2$ elétrons transferidos por mol de ET. Este número de elétrons é concordante com a redução do grupo nitro a hidroxilamina. A Figura 69 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados antes e após estas eletrólises.

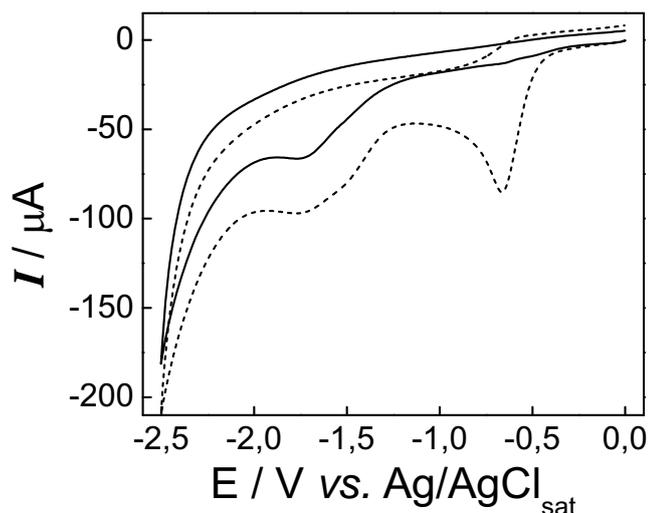


Figura 69 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em presença de 2,0 mmol L⁻¹ de ET contendo 0,1 mol L⁻¹ de HAc, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise. (—) Após a eletrólise.

A Figura 69 mostra que após a eletrólise em $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, o pico voltamétrico relativo à redução do grupo nitro desaparece completamente, enquanto o pico voltamétrico atribuído a quebra de ligações C-Cl permanece inalterado. Este resultado confirma que ambos os processos não são interdependentes. As soluções submetidas às eletrólises em $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ foram submetidas a uma nova eletrólise realizada em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. Estas eletrólises forneceram um valor médio de carga de $12,1 \pm 0,3 \text{ C}$, correspondendo a um número de elétrons transferidos por mol de fármaco igual a $4,1 \pm 0,1$. O número de elétrons encontrado é concordante com a quebra das duas ligações C-Cl da molécula de ET. Após a realização destas eletrólises, verificou-se o completo desaparecimento do pico com $E_p = -1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, indicando o completo consumo do fármaco, conforme apresentado na Figura 70.

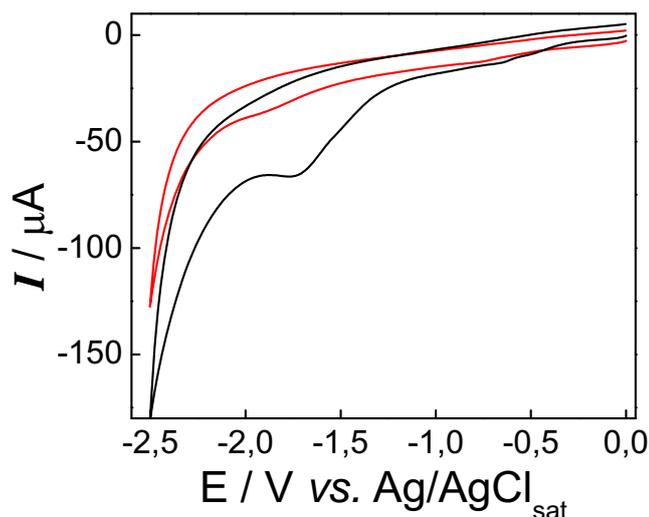


Figura 70 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ contendo 0,1 mol L⁻¹ de HAc, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Antes e (—) após a eletrólise em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$.

A Figura 71 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados antes e após as eletrólises realizadas em ambos os potenciais. Nestes voltamogramas cíclicos, o limite anódico foi estendido de modo que a oxidação da hidroxilamina pudesse ser visualizada.

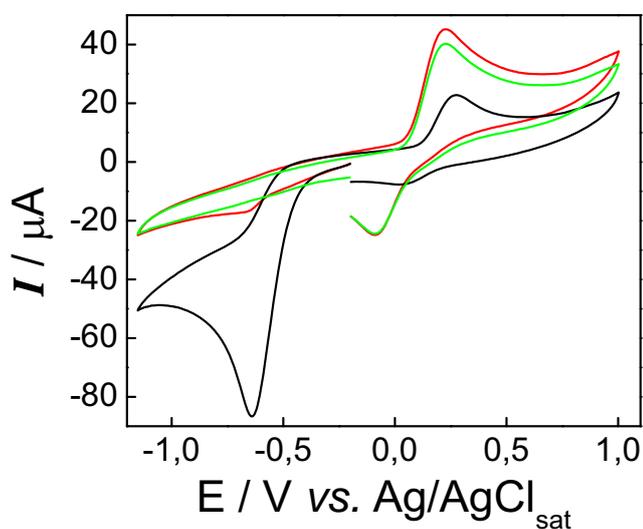


Figura 71 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ contendo 0,1 mol L⁻¹ de HAc, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Antes da eletrólise; $C_{\text{ET}} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise em $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. (—) Após a eletrólise em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 71 mostram que o produto eletrogerado na eletrólise realizada em $-1,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ apresenta o grupo hidroxilamina. Após a eletrólise realizada em $-2,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{\text{sat}}$, não se observa variação

significativa no pico relativo à oxidação da hidroxilamina, sugerindo que este grupo permanece inalterado durante esta eletrólise. Este resultado sugere que, nas condições experimentais adotadas, não ocorre a redução completa do grupo nitro a amina. Os voltamogramas cíclicos registrados no intervalo de 0,0 a +2,9 V após a realização da eletrólise em presença de 0,1 mol L⁻¹ de HAc aplicando-se -2,1 V também não apresentaram o pico voltamétrico referente à oxidação do cloreto.

4.3a.3 - Identificação dos produtos de eletrólise da ET

O espectro de H-RMN do padrão de ET é apresentado na Figura 72A e B, sendo as integrais expressas em termos do número de hidrogênios.

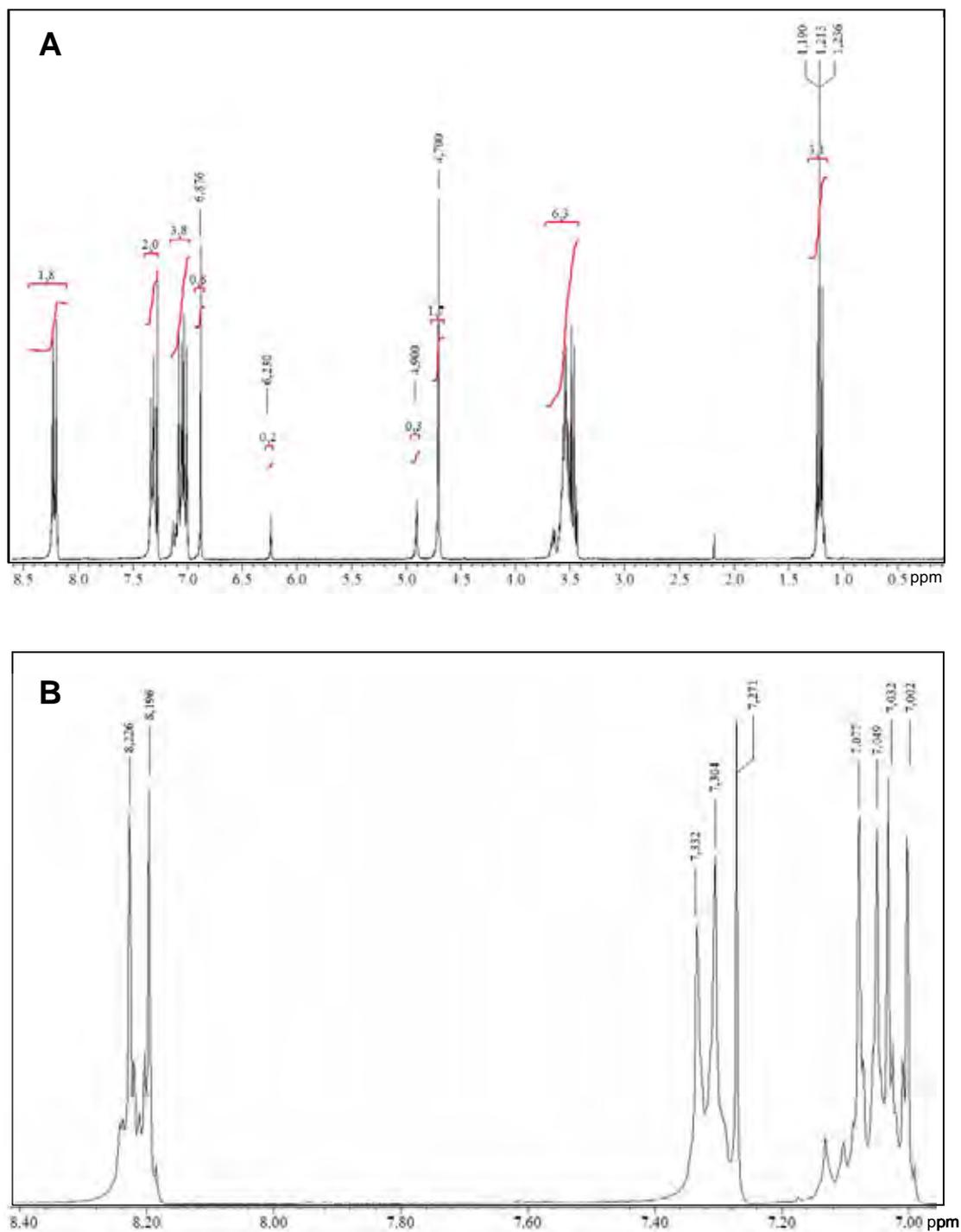


Figura 72 - Espectro de H-RMN da ET em CDCl_3 . 300 MHz. Massa de ET igual a 10 mg.

A Figura 73 apresenta a estrutura molecular da ET explicitando seus hidrogênios aromáticos.

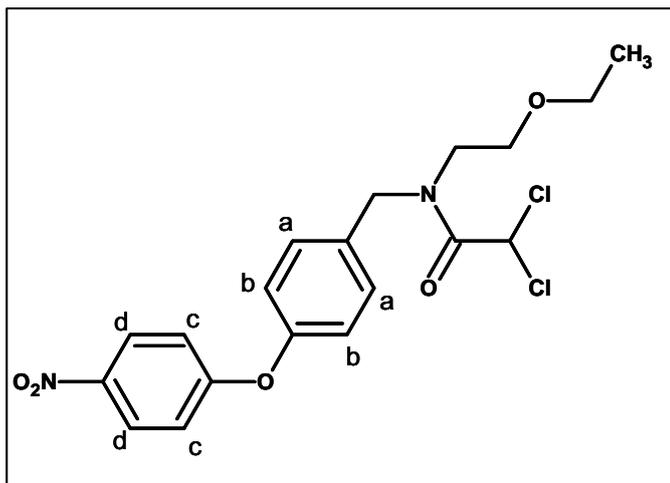


Figura 73 - Estrutura molecular da ET explicitando seus hidrogênios aromáticos.

Baseado na estrutura molecular da ET, o espectro de H-RMN apresentado na Figura 72 foi interpretado da seguinte maneira: δ (ppm, 300 MHz, CDCl_3): 1,21 (3H, t, $J = 6,9$ Hz, OCH_2CH_3); 3,47 – 3,67 (12H, m, OCH_2CH_3 e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4,7 (1,6H, s, ArCH_2N , 80 %); 4,89 (0,4H, s, ArCH_2N , 20 %); 6,22 (0,2H, s, CHCl_2 , 20 %); 6,88 (0,8 H, s, CHCl_2 , 80 %); 7,02 (2H, d, $J = 9,0$ Hz $\underline{H_c}$); 7,06 (2H, d, $J = 8,4$ Hz $\underline{H_a}$); 7,32 (2H, d, $J = 8,4$ Hz $\underline{H_b}$); 8,21 (2H, d, $J = 9,0$ Hz $\underline{H_d}$). O espectro da ET evidencia a presença de isômeros assim como o observado para o TEC, a proporção entre os isômeros também foi de 80:20 %.

Assim como para os outros fármacos estudados, a eficiência do procedimento de extração foi avaliada também para a ET. Para isto preparou-se 15 mL de uma solução contendo 20 mg do fármaco em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o que equivale a uma concentração de ET igual a $3,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Esta solução foi submetida ao procedimento de extração, sendo verificada uma recuperação de 85 %. O espectro de H-RMN obtido para este resíduo foi idêntico ao obtido para o padrão do fármaco e isento de sinais associados ao eletrólito de suporte ou a solventes utilizados na extração, confirmando a eficiência do procedimento adotado. Assim como observado para as outras duas dicloroacetamidas, verificou-se que ambos os processos eletródicos associados à redução da ET não sofreram alterações significativas substituindo-se o TBABF_4 por TEABr . Assim, os produtos identificados utilizando TEABr como eletrólito de suporte devem ser representativos daqueles obtidos em TBABF_4 .

As eletrólises da ET foram realizadas utilizando a célula eletroquímica apresentada na Figura 3, sendo eletrolisados 25 mL de uma solução $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, o que corresponde a

27 mg do fármaco. As curvas amperométricas obtidas nestas eletrólises foram concordantes com as obtidas previamente, fornecendo o mesmo número de elétrons transferidos por mol do fármaco. Os voltamogramas cíclicos registrados após estas eletrólises mostraram o total desaparecimento dos picos voltamétricos relativos à ET, indicando o completo consumo do fármaco durante as eletrólises. O espectro resultante da análise da fase orgânica da extração da solução eletrolisada é apresentado na Figura 74.

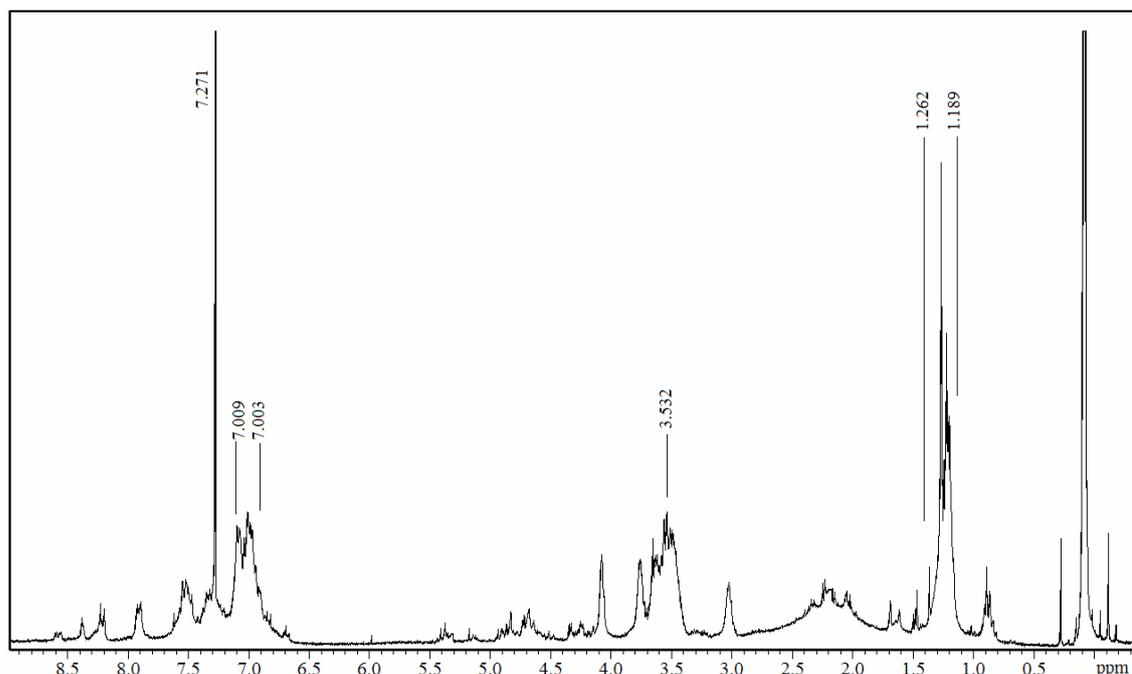


Figura 74 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹. 300 MHz em CDCl₃.

O espectro apresentado na Figura 74 é complexo e sugere uma mistura de produtos. Neste espectro não são observados sinais relativos aos grupamentos CHCl₂. A massa de resíduo obtido foi de apenas 3 mg, sendo que a análise da fase aquosa não revelou a presença de nenhum sinal além de resíduos de solventes utilizados na extração. Assim, por meio do espectro apresentado na Figura 74 não é possível identificar nenhum produto eletrogerado. Os estudos por CCD também não forneceram informações adicionais sobre a quantidade de produtos eletrogerados, uma vez que utilizando tanto acetato de etila quanto a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) como fase móvel, foi observada uma mancha cromatográfica difusa que se espalhou ao longo da placa cromatográfica. Esta mancha, provavelmente, está associada a uma série de produtos de eletrólise.

O fato de em $-2,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat} dois pontos da molécula sofrerem redução simultaneamente poderia ser o responsável pelas drásticas alterações da molécula da ET. Assim, foi realizada uma eletrólise nas mesmas condições, porém aplicando-se $-1,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat}, potencial suficiente para promover apenas a redução do grupo nitro. A curva amperométrica relativa a esta eletrólise mostrou um comportamento particular, sendo observado que a corrente permaneceu praticamente constante ao longo do tempo não apresentando o decréscimo exponencial típico. Esta eletrólise foi interrompida após a obtenção de uma carga correspondente ao dobro da carga esperada considerando que o primeiro processo envolve apenas um elétron. O tempo necessário para que esta carga fosse atingida foi de aproximadamente 30 min. A Figura 75 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados antes e após esta eletrólise.

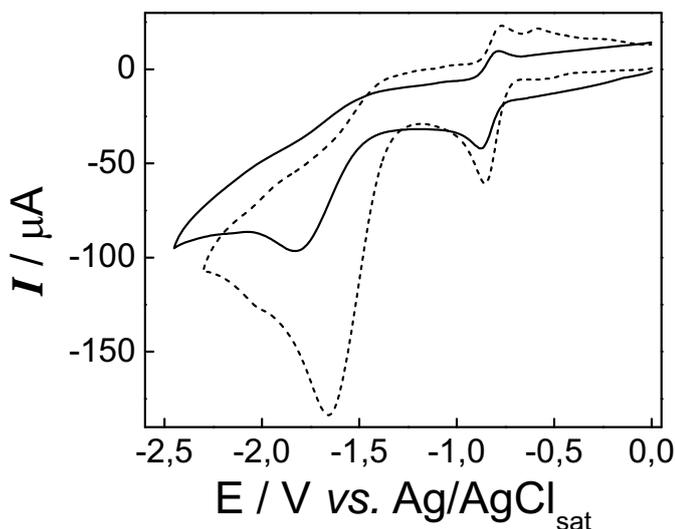


Figura 75 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio de ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{ET} = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

A Figura 75 mostra que após a eletrólise ainda pode-se observar os picos voltamétricos relativos ao grupo nitro, embora estes tenham diminuído de intensidade. Para o segundo pico voltamétrico verifica-se uma diminuição ainda mais acentuada, sugerindo que, mesmo nesta eletrólise houve quebra das ligações C-Cl, o que foi confirmado pelo espectro de H-RMN apresentado na Figura 76.

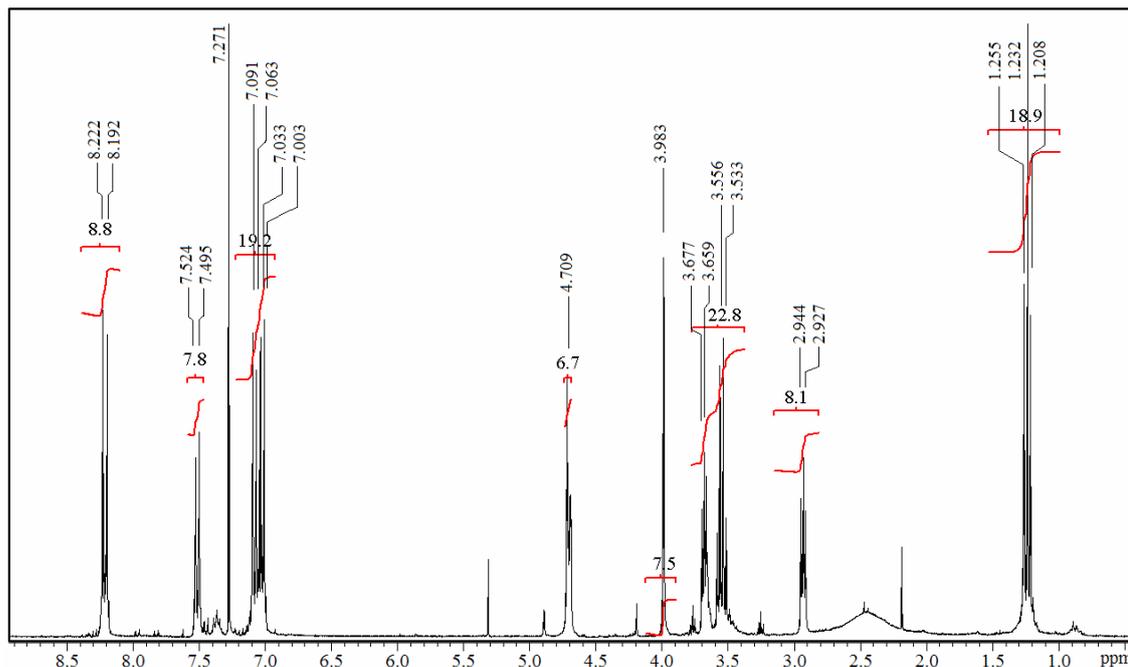


Figura 76 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se $-1,1 \text{ V}$. 300 MHz em CDCl_3 .

O espectro apresentado na Figura 76 é relativamente complexo e não permite uma identificação precisa dos produtos eletrogerados. Neste espectro pode-se observar alguns sinais concordantes com os da molécula da ET, mostrando que parte da molécula permanece inalterada após a eletrólise. Assim, verifica-se que não houve alterações significativas nos sinais dos hidrogênios aromáticos, do grupamento OCH_2CH_3 e do grupamento Ar-CH_2 . Entretanto, verifica-se alterações consideráveis nos sinais relativos aos grupamentos OCH_2CH_3 e NCH_2CH_2 . Um aspecto interessante deste espectro é a ausência completa do sinal relativo ao grupamento CHCl_2 , confirmando a quebra das ligações C-Cl mesmo na eletrólise realizada em potenciais mais positivos. Entretanto, no potencial utilizado nesta eletrólise, o grupo CHCl_2 aparentemente não é reduzido a metila, mas sim ao grupamento CH_2Cl o qual seria responsável pelo singlete observado em 3,98 ppm. Este resultado indica a presença de um efeito catalítico promovido pelo ânion-radical $\text{R-NO}_2^{\bullet-}$. Assim, o ânion-radical transfere seu elétron para uma ligação C-Cl de uma outra molécula de ET, quebrando esta ligação e se reoxidando. Após a oxidação do ânion-radical ao grupo nitro, este é imediatamente reduzido novamente ao ânion-radical, dando continuidade ao ciclo catalítico. Este ciclo catalítico é concordante com o perfil observado na curva amperométrica, como o grupo nitro é continuamente reduzido e reoxidado na interface eletrodo/solução, sua concentração

permanece praticamente inalterada ao longo do tempo, conseqüentemente, a corrente permanece também constante ao longo do tempo. A presença deste efeito catalítico mostra que nas eletrólises realizadas em $-2,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat} vários processos ocorrem simultaneamente. Assim, neste potencial, provavelmente, ocorre a quebra de ligações C-Cl diretamente sobre a superfície eletródica e também catalisada pelo grupo nitro.

A massa de resíduo obtida nesta extração foi de 14 mg, sugerindo que os produtos eletrogerados apresentem certa semelhança estrutural com a ET. O espectro de H-RMN relativo à fase aquosa não apresentou nenhum sinal além daqueles referentes a solventes utilizados na extração. As análises por CCD para esta eletrólise também apresentaram grande número de manchas cromatográficas. Utilizando acetato de etila como fase móvel, foram obtidas cinco manchas, uma permaneceu na origem e as outras quatro apresentaram $R_f = 0,31; 0,34; 0,60$ e $0,76$; sendo o R_f da ET nesta placa cromatográfica igual a $0,83$. Utilizando a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) também foram obtidas cinco manchas, uma na origem e as outras quatro com $R_f = 0,03; 0,30; 0,49; 0,56$; sendo o R_f da ET igual a $0,70$. Assim, os estudos por CCD, demonstraram que mesmo para a eletrólise realizada em potencial mais positivo, continua a ser obtida uma complexa mistura de produtos de eletrólise.

Visando a obtenção de informações adicionais sobre a redução eletroquímica da ET, foram realizadas eletrólises no potencial relativo ao primeiro pico da ET na presença de $0,1$ mol L⁻¹ de HFP. Estas eletrólises forneceram uma carga média, já descontada, a carga residual de $24,8$ C, correspondendo a $4,1 \pm 0,1$ elétron por mol de ET. Assim, o número de elétrons obtido é concordante com a redução do grupo nitro a hidroxilamina, sendo este resultado também concordante com os resultados obtidos previamente. Os voltamogramas cíclicos registrados após estas eletrólises mostraram o completo desaparecimento do pico relativo à redução do grupo nitro enquanto o pico atribuído à quebra redutiva das ligações C-Cl permaneceu inalterado. O espectro de H-RMN relativo à análise da fase orgânica proveniente desta eletrólise é apresentado na Figura 77. Neste espectro as integrações são relativas ao número de hidrogênios.

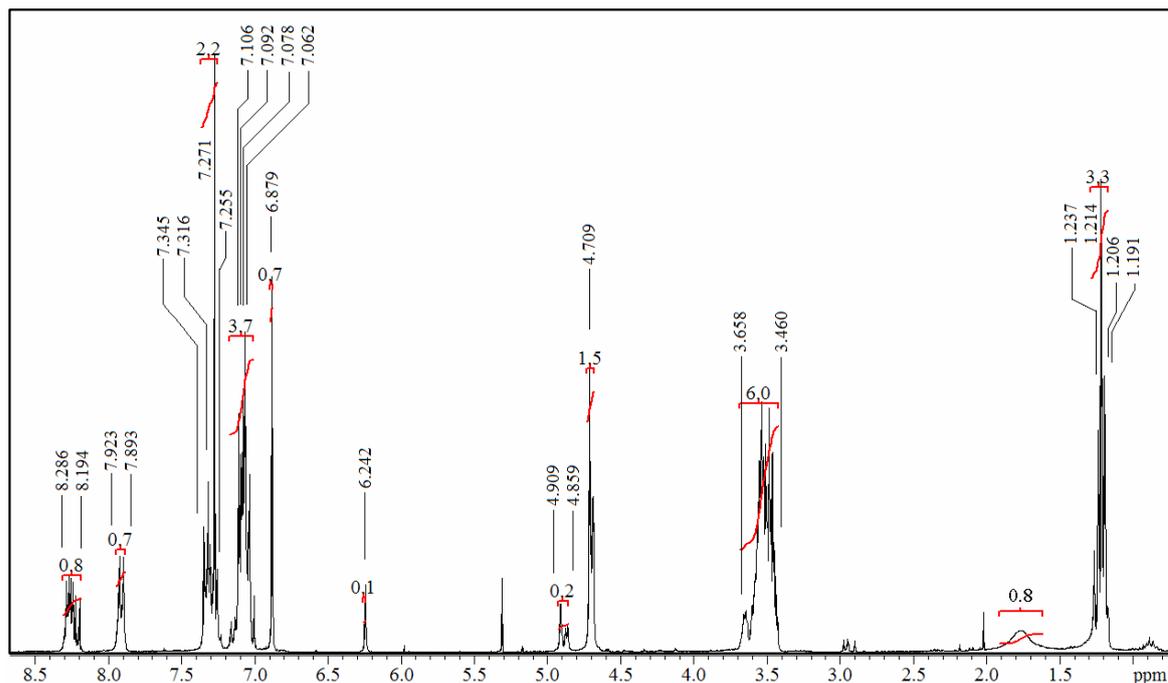


Figura 77 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr 0,1 mol L⁻¹, aplicando-se -1,1 V vs. Ag/AgCl_{sat} em presença de doador de prótons. 300 MHz em CDCl₃.

O espectro apresentado na Figura 77 apresenta desdobramentos incomuns dos sinais, sugerindo a presença de diferentes isômeros. De modo geral, observa-se que o espectro assemelha-se muito ao espectro do padrão de ET. A única alteração observada está nos sinais relativos aos hidrogênios aromáticos, indicando alguma alteração estrutural em algum dos anéis benzênicos. Este resultado sugere que a única alteração na molécula da ET promovida pela eletrólise foi à conversão do grupo nitro a hidroxilamina. A visualização do sinal relativo ao OH da hidroxilamina é dificultada em virtude do sinal de hidroxilas poder variar em um amplo intervalo de δ , em função da concentração da espécie ou da presença de água residual na amostra. O singlete largo entre 1,6 e 2,0 ppm, cuja integração fornece 0,8 H é um forte indício da formação da hidroxilamina. O sinal do hidrogênio referente ao grupamento N-H da hidroxilamina é igualmente difícil de ser visualizado. Assim, o espectro apresentado na Figura 77 fornece apenas indícios da formação da hidroxilamina. Os estudos por CCD mostraram uma única mancha cromatográfica utilizando tanto acetato de etila como a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v) como fase móvel, sendo obtidos, respectivamente, $R_f = 0,71$ e $0,69$, sendo o R_f da ET em ambas as fases móvel, respectivamente: $0,81$ e $0,70$. A confirmação da presença do grupo hidroxilamina nos produtos de eletrólise foi obtida pela

técnica de voltametria cíclica. Foi registrado, após a eletrólise na presença do doador de prótons, um voltamograma cíclico estendendo-se o limite anódico. Neste voltamograma, pôde-se visualizar o par de picos referente à oxidação da hidroxilamina a seu derivado nitroso.

Visando identificar o produto da redução completa da ET em presença do doador de prótons, foram realizadas eletrólises em $-2,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat}. Entretanto, o espectro de H-RMN obtido também se mostrou complexo e os estudos por CCD também apresentaram manchas cromatográficas difusas ao longo das placas cromatográficas, utilizando ambas as fases móveis. Diante deste resultado, optou-se por realizar a redução completa da ET em etapas. Primeiramente, a solução foi eletrolisada em $-1,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat} e, após o final desta eletrólise, aplicou-se $-2,1$ V vs. Ag/AgCl_{sat}. Estas eletrólises forneceram um número médio de 4 elétrons por mol do fármaco para ambos os processos. O espectro de H-RMN relativo à fase orgânica desta eletrólise é apresentado na Figura 78.

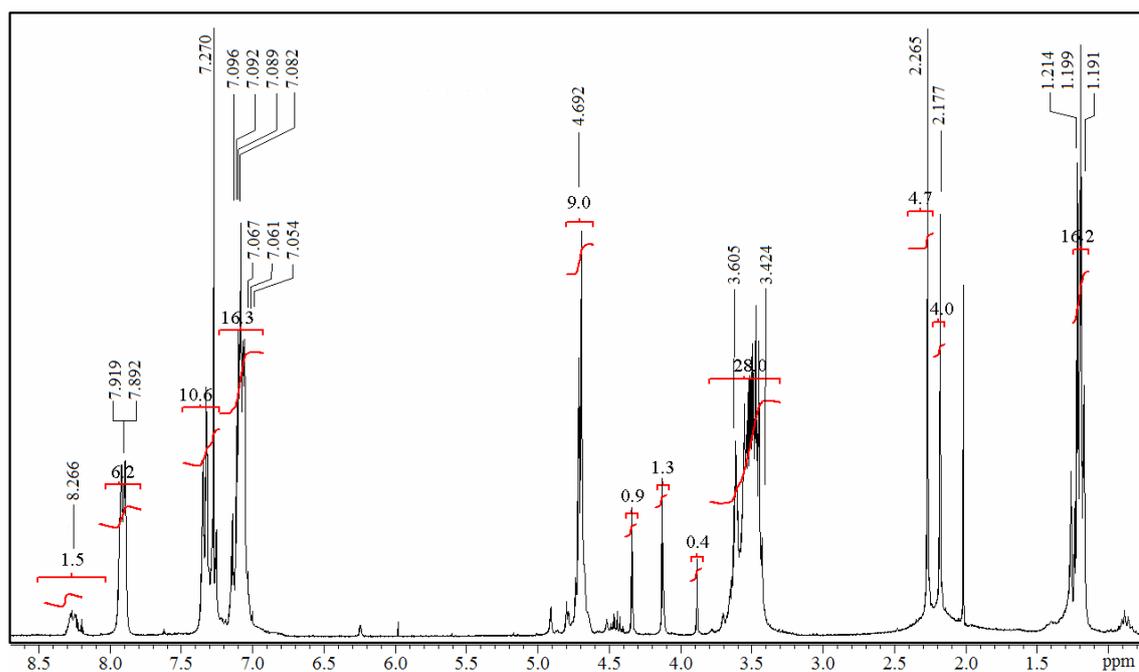


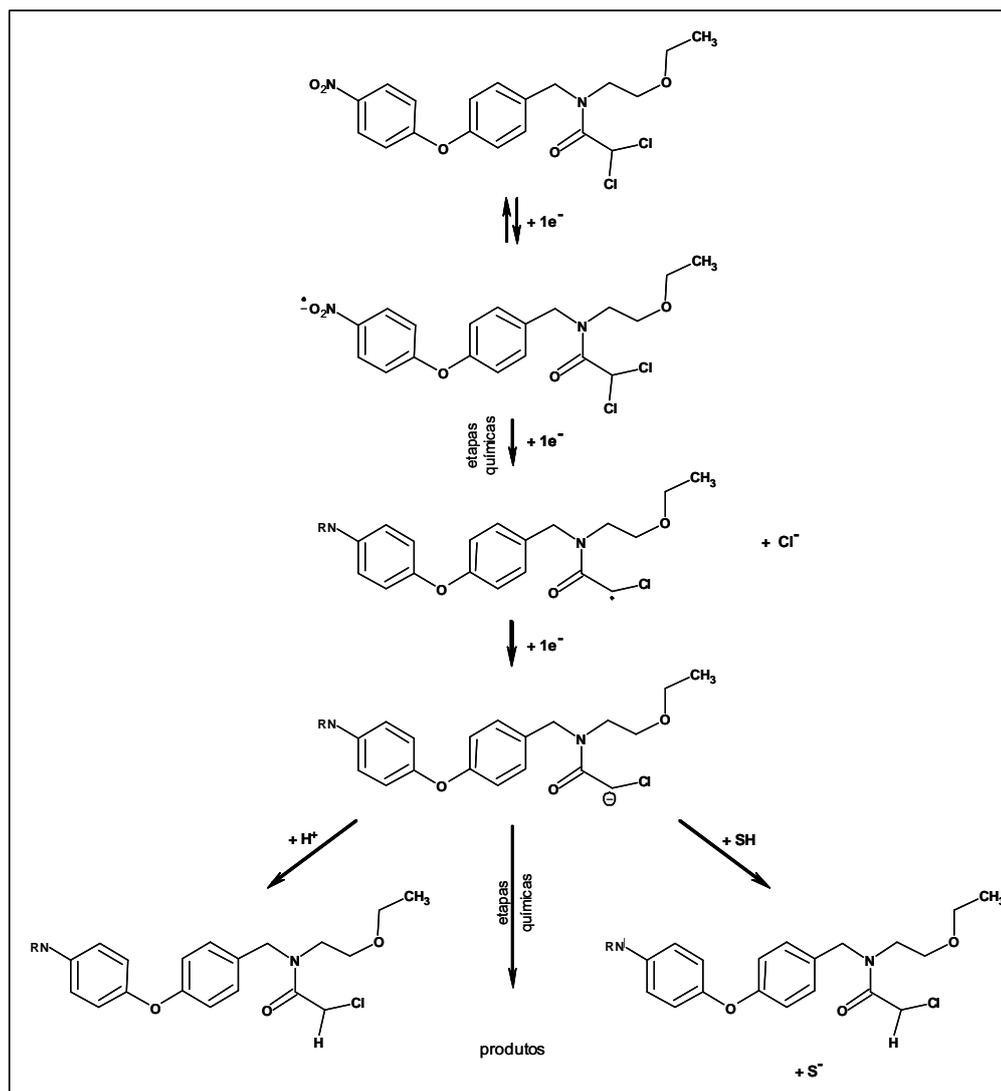
Figura 78 - Espectro de H-RMN do resíduo obtido após extração da solução de ET eletrolisada em ACN/TEABr $0,1$ mol L^{-1} , aplicando-se consecutivamente $-1,1$ V e $-2,1$ V em presença de doador de prótons. 300 MHz em $CDCl_3$.

O espectro apresentado na Figura 78 também é relativamente complexo e não permite a identificação precisa de nenhum produto eletrogerado. Entretanto, neste espectro verifica-se o completo desaparecimento do sinal relativo ao grupamento $CHCl_2$ e o aparecimento de dois

singletons em 2,18 e 2,26 ppm, os quais estão associados à metila do grupamento NCOCH_3 . Assim, embora o espectro apresentado na Figura 78 não permita a identificação precisa de nenhum produto, ele mostra que durante as eletrólises da ET ocorreu a quebra de ligações C-Cl da molécula do fármaco, originando os grupamentos NCOCH_3 . Verifica-se ainda neste espectro, alterações nos sinais relativos aos hidrogênios aromáticos, o que sugere a conversão do grupo nitro a hidroxilamina. Os voltamogramas cíclicos registrado após estas eletrólises estendendo-se o intervalo anódico apresentaram o par de picos relativo à oxidação da hidroxilamina. As análises por CCD não forneceram informações adicionais sobre o número de produtos formados, pois novamente foram obtidas manchas difusas ao longo das placas cromatográficas utilizando tanto acetato de etila quanto a mistura acetato de etila:éter de petróleo (1:1 v/v). O espectro de H-RMN resultante da análise da fase aquosa não apresentou nenhum sinal além daqueles relativos a solventes utilizados na extração.

Desta maneira, os estudos realizados com a ET na ausência de um doador de prótons não permitiram a identificação precisa de nenhum de seus produtos de redução. Porém, os espectros de H-RMN obtidos mostraram o desaparecimento dos sinais relativos ao grupamento CHCl_2 , indicando que a redução da ET envolve a quebra de suas ligações C-Cl. Na presença de um doador de prótons, além da quebra de ligações C-Cl, verificou-se também a redução do grupo nitro da ET a hidroxilamina.

Apesar dos resultados obtidos não permitirem que uma seqüência reacional detalhada seja proposta para a quebra redutiva das ligações C-Cl da ET, a irreversibilidade deste processo aliada ao valor de α menor do que 0,5 sugerem que as transferências eletrônicas ocorram conjuntamente à quebra de ligações. O número de elétrons encontrado mostra que a quebra de cada uma das ligações C-Cl da ET envolve a transferência de dois elétrons, sugerindo que os radicais formados são reduzidos aos correspondentes carbânions. Além disso, o grande número de produtos formados durante a redução eletroquímica da ET, indica que o ânion-radical R-NO_2^\bullet e os carbânions desalogenados sofram uma série de reações químicas. Assim, estes resultados podem ser compilados em uma seqüência reacional mostrando a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl da ET, a qual é apresentada no Esquema 18. Esta seqüência é também válida para a quebra redutiva da outra ligação C-Cl da ET.



Esquema 18 - Seqüência reacional para a quebra redutiva de uma das ligações C-Cl da ET.

4.3a.4 - Métodos eletroanalíticos para a determinação da ET

Os estudos analíticos envolvendo a ET foram realizados por meio do monitoramento do pico voltamétrico relativo à redução do grupo nitro da molécula de ET. Este processo, além de originar um pico mais definido do que o segundo, ocorre em potenciais mais positivos, permitindo, portanto, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos mais seletivos. Além disso, a redução eletroquímica do grupo nitro em meio aprótico ocorre via uma transferência eletrônica reversível, o que influencia positivamente na sensibilidade, pois as técnicas voltamétricas são mais sensíveis para processos reversíveis.

Os estudos visando o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para quantificação da ET foram realizados utilizando a mesma metodologia empregada para o FD e para o TEC. Para a construção das curvas analíticas e de adição de padrão foi realizada a correção de volume, visando corrigir a diluição sofrida pelo analito em função das sucessivas adições da solução estoque de ET. Os métodos eletroanalíticos foram desenvolvidos utilizando as técnicas de LSV, DPV e SWV. Previamente ao desenvolvimento dos métodos voltamétricos para quantificação da ET, foi realizado um estudo de otimização dos parâmetros operacionais de cada técnica voltamétrica empregada. Estes estudos foram realizados utilizando a mesma metodologia e critérios adotados para as outras duas dicloroacetamidas estudadas. Seguindo esta metodologia foram obtidos os seguintes parâmetros otimizados: para LSV $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; para a DPV $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $t_p = 50 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; para SWV $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $f = 300 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, estes parâmetros correspondem a uma velocidade de varredura igual a $1,2 \text{ V s}^{-1}$. Utilizando o parâmetros otimizados, foram registrados voltamogramas em diferentes concentrações de ET, os quais foram utilizados para a construção de curvas analíticas. Os voltamogramas obtidos e as respectivas curvas analíticas são apresentados nas Figuras 79, 80 e 81.

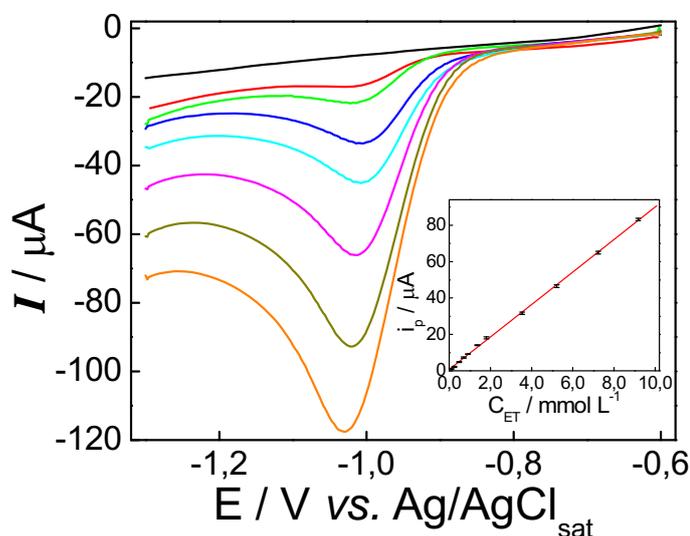


Figura 79 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de ET. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (—) 0,0; (—) 0,5; (—) 1,0; (—) 2,0; (—) 3,0; (—) 5,0; (—) 7,5; (—) 10,0 mmol L⁻¹ de ET. Curva analítica inserida.

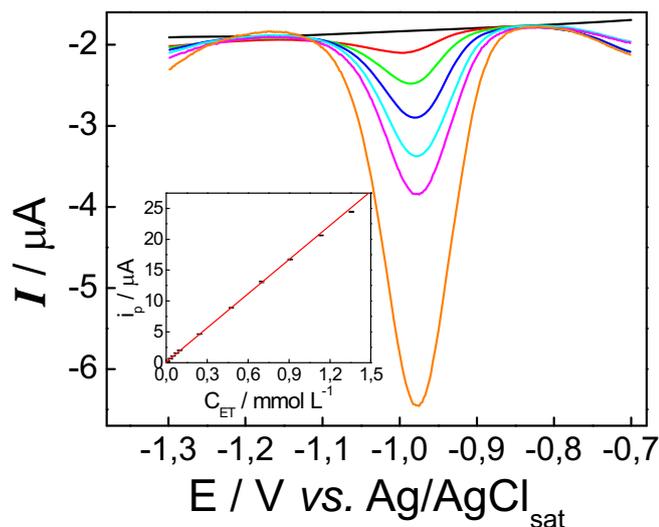


Figura 80 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de ET. (—) 0,0; (—) 0,01; (—) 0,03; (—) 0,05; (—) 0,75; (—) 0,10; (—) 0,25 mmol L⁻¹ de ET. $\Delta E = 50$ mV, $t_p = 50$ ms, $v = 10$ mV s⁻¹. Curva analítica inserida.

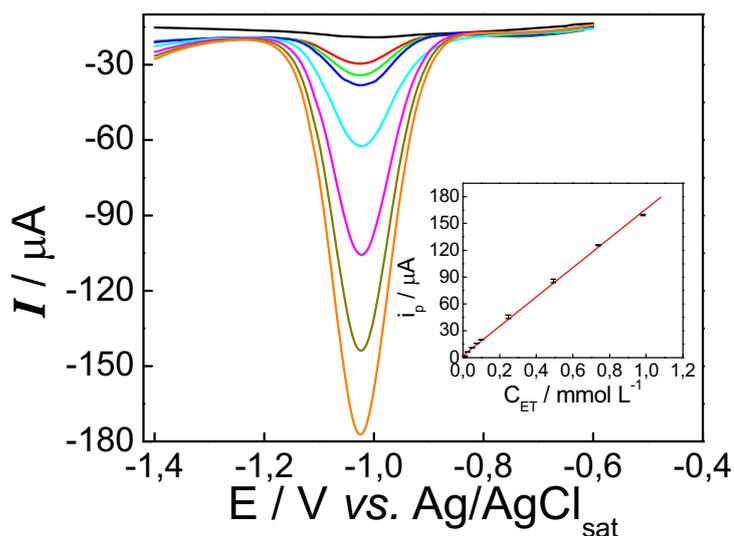


Figura 81 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes concentrações de ET. (—) 0,0; (—) 0,05; (—) 0,075; (—) 0,1; (—) 0,25; (—) 0,5; (—) 7,5; (—) 1,0 mmol L⁻¹ de ET. $\Delta E = 50$ mV, $f = 300$ Hz, $\Delta E_s = 4,0$ mV. Curva analítica inserida.

A Tabela 11 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com as técnicas de LSV, DPV e SWV para a ET em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

Tabela 11 - Parâmetros analíticos obtidos com as técnicas LSV, DPV e SWV para a determinação de ET em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹.

Técnica	Equação da reta $i_p / \mu\text{A} = C_{\text{ET}} / \text{mol L}^{-1}$	L.R.* $/ \mu\text{mol L}^{-1}$	S $/ \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$	LD $/ \text{mol L}^{-1}$	Detectabilidade $/ \text{mol L}^{-1}$
LSV	$i_p = 0,48 + 8,9 \times 10^3 C_{\text{ET}},$ R = 0,9996	100 – 10000	$8,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
DPV	$i_p = 0,11 + 1,8 \times 10^4 C_{\text{ET}},$ R = 0,9994	10 – 1500	$1,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
SWV	$i_p = 0,21 + 1,6 \times 10^5 C_{\text{ET}},$ R = 0,9995	2,5 – 1000	$1,6 \times 10^5$	$8,7 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$

* L.R. – Intervalo linear.

A Tabela 11 mostra que todas as técnicas voltamétricas estudadas mostraram-se sensíveis, apresentando baixos valores de LD e um amplo intervalo linear (superior a uma década de concentração). Estes resultados sugerem que as técnicas voltamétricas são promissoras para serem empregadas na determinação de ET em formulações farmacêuticas. A sensibilidade obtida com a técnica de SWV foi aproximadamente dez vezes maior do que a apresentada pela técnica de DPV, a qual, por sua vez, foi cerca de duas vezes mais sensível do que a LSV. A técnica de SWV foi também a que apresentou o menor valor de LD, o qual foi mais de duas ordens de grandeza mais baixo do que o obtido com a LSV e cerca de meia ordem de grandeza mais baixo do que o obtido com a DPV. O desempenho analítico marcadamente superior apresentado pela técnica de SWV é uma consequência da reversibilidade do processo eletródico no qual é baseada a detecção eletroquímica, o que faz com que a corrente reversa tenha numa grande contribuição na corrente resultante, causando sua intensificação. Os pontos das curvas analíticas correspondem ao valor médio de três medidas. Em todos os casos, os desvios padrão relativos de cada ponto das curvas analíticas foram menores do que 3,0 %, indicando que os métodos voltamétricos desenvolvidos apresentam uma repetitividade adequada. A detectabilidade determinada para as diferentes técnicas voltamétricas estudadas corresponde ao primeiro ponto da curva analítica, uma vez que menores concentrações da ET não apresentaram qualquer pico voltamétrico ou aumento significativo do sinal do branco.

As técnicas voltamétricas estudadas foram empregadas para a determinação de ET em uma amostra comercial de formulação farmacêutica, cujo teor nominal de ET é de 500 mg por

comprimido. Para a determinação de ET nesta formulação farmacêutica, cinco comprimidos foram macerados, sendo o sólido resultante dissolvido em ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ e submetido à análise empregando-se o método de adição de padrão. A massa média dos comprimidos foi determinada, sendo obtido o valor de 0,5454 g. Para a determinação de ET pela técnica de LSV uma massa de 0,0233 g do sólido resultante foi dissolvida em 50 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, conduzindo a uma concentração nominal de ET de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Alíquotas de 10 mL desta solução foram transferidas para a célula eletroquímica e submetidas a análise. Para a determinação de ET pelas técnicas de DPV e SWV uma massa de 0,0093 g do sólido obtido pela maceração dos comprimidos foi dissolvida em 100 mL de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹, conduzindo a uma concentração nominal de ET de 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Alíquotas de 10 mL desta solução foram transferidas para a célula eletroquímica e submetidas à análise. As curvas voltamétricas da amostra de ET e das sucessivas adições de padrão obtidas pelas técnicas de LSV, DPV e SWV são apresentadas nas Figuras 82, 83 e 84. Nestas figuras são apresentadas também as respectivas curvas de adição de padrão.

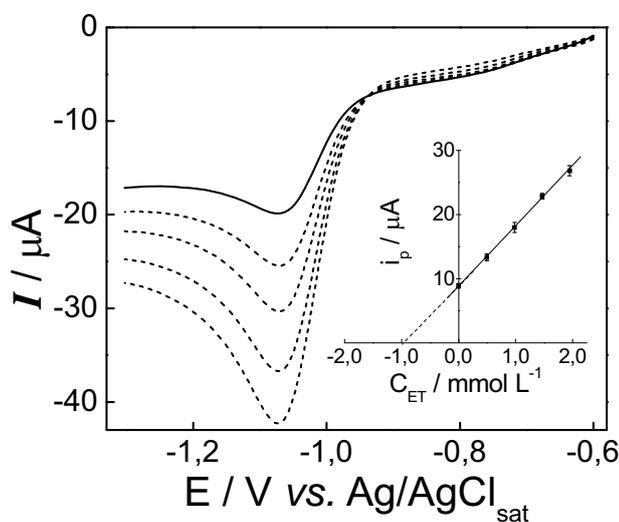


Figura 82 - Voltamogramas de varredura linear registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 50 μL de uma solução estoque de ET 0,1 mol L⁻¹ a 10 mL de solução. Curva de adição de padrão inserida.

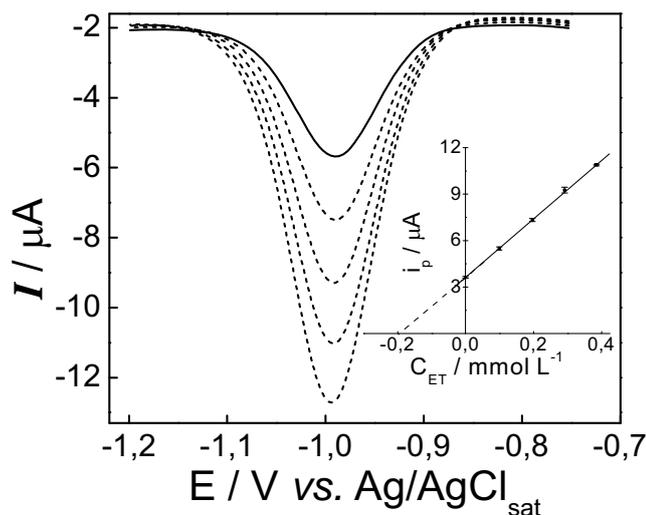


Figura 83 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 100 μL de uma solução estoque de ET 10 mmol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições: ΔE = 50 mV, t_p = 50 ms, v = 10 mV s⁻¹. Curva de adição de padrão inserida.

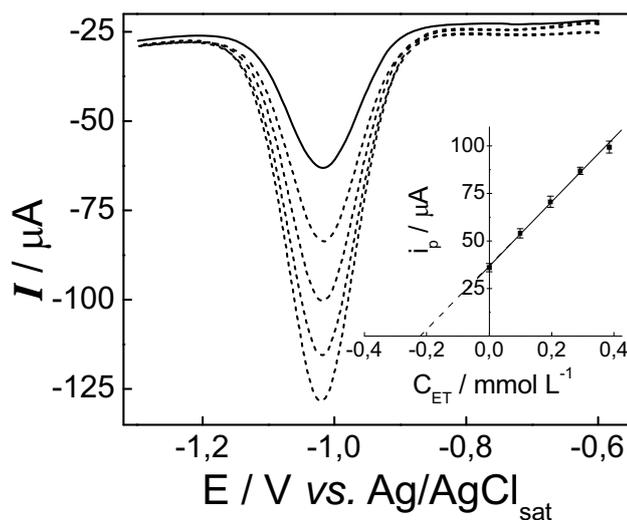


Figura 84 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de ACN/TBABF₄ 0,1 mol L⁻¹. (—) Amostra comercial. (---) Sucessivas adições de 100 μL de uma solução estoque de ET 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ a 10 mL de solução. Condições: f = 200 Hz, ΔE = 50 mV, ΔE_s = 2,0 mV. Curva de adição de padrão inserida.

Verifica-se que os voltamogramas registrados na amostra comercial são idênticos àqueles registrados em presença do padrão de ET. Estas observações mostram que os excipientes presentes na formulação farmacêutica não interferem significativamente na determinação voltamétrica da ET, indicando que as técnicas voltamétricas são apropriadas para a determinação deste fármaco em formulações farmacêuticas. Os voltamogramas

apresentados obtidos com as três técnicas voltamétricas estudadas foram utilizados para construir as curvas de adição de padrão. Para cada técnica utilizada foram realizadas cinco determinações a fim de se avaliar a repetitividade dos métodos eletroanalíticos desenvolvidos. Foram obtidas as seguintes equações de reta para as curvas de adição de padrão: para LSV $i_p (\mu\text{A}) = 8,9 + 8,9 \times 10^3 C_{\text{ET}} (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,9997; para DPV $i_p (\mu\text{A}) = 3,6 + 1,9 \times 10^4 C_{\text{ET}} (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,9999; para SWV $i_p (\mu\text{A}) = 33,8 + 1,7 \times 10^5 C_{\text{ET}} (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,9988. As equações de reta obtidas mostram que os coeficientes angulares das curvas de adição de padrão foram muito próximos aos das curvas analíticas construídas com o padrão puro do fármaco, independentemente da técnica utilizada. Este resultado confirma que a formulação farmacêutica não apresenta qualquer efeito de matriz.

Os resultados da determinação de ET no medicamento comercial bem como os resultados dos estudos de adição e recuperação são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da determinação de ET na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos.

Técnica	Encontrado ^a mg / comprimido	Adicionado / mol L ⁻¹	Recuperado / mol L ⁻¹	t ^b	Recuperação / %
LSV	496 ± 14	5,00 x 10 ⁻⁴	(4,94 ± 0,10) x 10 ⁻⁴	1,3	98 ± 4
DPV	494 ± 13	1,00 x 10 ⁻⁴	(1,02 ± 0,03) x 10 ⁻⁴	1,5	102 ± 3
SWV	506 ± 16	1,00 x 10 ⁻⁴	(0,99 ± 0,02) x 10 ⁻⁴	1,1	99 ± 2

^aMédia de cinco determinações. ^bt_{crítico} = 2,78 (P = 0,05, 4 graus de liberdade) [76]. Teste-t corresponde à comparação estatística entre os valores adicionados vs. recuperados.

A Tabela 12 mostra que os teores de ET determinados foram muito próximos ao conteúdo nominal do fármaco na formulação farmacêutica para todas as técnicas voltamétricas estudadas. Este resultado indica que a amostra comercial encontra-se dentro das especificações em relação ao teor do princípio ativo. As porcentagens de recuperação foram próximas a 100 % para todas as técnicas voltamétricas estudadas, indicando a validade destas técnicas para a quantificação da ET nesta formulação farmacêutica. Os desvios padrão relativos dos valores recuperados variaram entre 2,0 e 3,0 % para os diferentes métodos desenvolvidos, indicando que estes apresentam uma repetitividade bastante adequada. A

comparação estatística pelo teste-t entre os teores adicionados e recuperados revelou que não existem diferenças estatísticas entre estes teores para nenhum dos métodos voltamétricos desenvolvidos, uma vez que em nenhuma situação os valores de t excederam o valor crítico. Este resultado mostra também que não são encontradas evidências da presença de erros sistemáticos nos resultados obtidos pelos métodos voltamétricos desenvolvidos. Este conjunto de resultados mostra que as técnicas voltamétricas podem ser empregadas com êxito na determinação de ET nesta formulação farmacêutica sem a necessidade de qualquer etapa de pré-tratamento da amostra, permitindo uma quantificação de maneira simples e rápida.

4.3b - Estudo da redução eletroquímica da ET em meio misto

Para o estudo da redução eletroquímica da ET sobre carbono vítreo em meio misto, a mistura ACN:tampão B.R. foi preparada de modo a se utilizar a menor porcentagem possível de ACN sem comprometer a solubilidade do fármaco. Desta maneira, foram realizados estudos de solubilidade, nos quais uma massa de ET foi adicionada a misturas ACN:tampão B.R. em diferentes proporções, de modo a serem obtidas soluções $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET. Observou-se que a porcentagem mínima de ACN que permite o preparo de uma solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET sem a subsequente precipitação do fármaco é 40 %. Assim, esta porcentagem de ACN foi empregada para o estudo da redução eletroquímica da ET em meio misto.

4.3b.1 - Experimentos voltamétricos

O comportamento voltamétrico da ET na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) foi estudado em diferentes valores de pH*, no intervalo de 1,0 a 14,0 Neste estudo, foram registrados voltamogramas cíclicos no intervalo de 0,0 V até a observação do início do processo de descarga catódica do sistema solvente/eletrolito. Os voltamogramas cíclicos registrados em presença de ET em diferentes valores de pH* são apresentados na Figura 85.

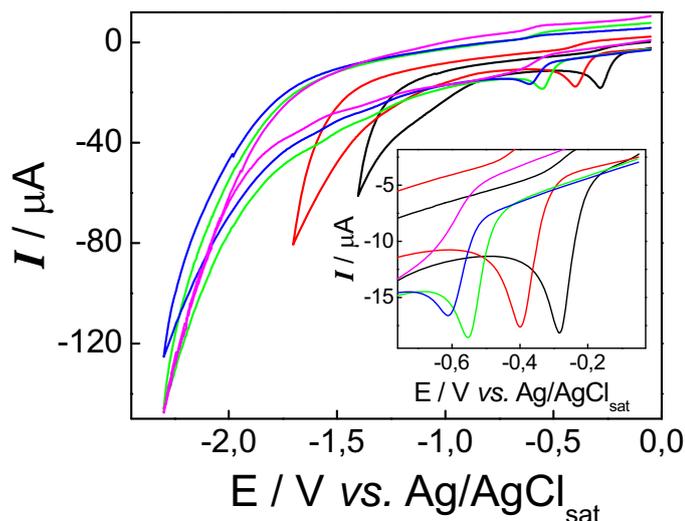


Figura 85 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes valores de pH^* . $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $C_{\text{ET}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) $\text{pH}^* = 1,0$; (—) $\text{pH}^* = 4,0$; (—) $\text{pH}^* = 8,0$; (—) $\text{pH}^* = 10,0$; (—) $\text{pH}^* = 12,0$.

A Figura 85 mostra que em todos os valores de pH^* estudados a ET apresentou um único pico catódico sem o correspondente pico anódico na varredura reversa. Este pico, a exemplo do observado em ACN na presença de um doador de prótons, pode ser atribuído à redução do grupo nitro da ET a hidroxilamina. O estudo da redução eletroquímica da ET em ACN mostrou que neste solvente foi possível observar também o pico voltamétrico relativo à quebra redutiva das ligações C-Cl da ET. Em meio misto não foi possível a visualização deste pico em nenhum dos pH^* estudados. Neste meio, provavelmente, a quebra redutiva das ligações C-Cl ocorre junto à descarga catódica do sistema solvente/eletrólito, o que impede a visualização do pico voltamétrico relativo a este processo.

Verificou-se que os valores de E_p e i_p relativos ao pico de redução da ET sofrem influência do pH^* , indicando a presença de reações de protonação acopladas às transferências eletrônicas, o que é concordante com a redução do grupo nitro em meio prótico. A Figura 86 apresenta a variação de i_p e E_p do pico relativo à redução da ET em função do pH^* .

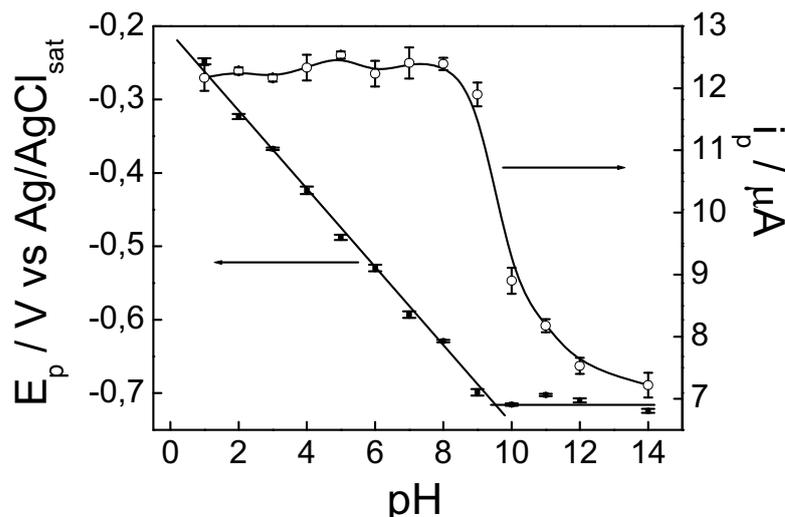


Figura 86 - Influência do pH^* sobre os valores de i_p e E_p relativos à redução da ET em meio misto.

A Figura 86 mostra uma dependência linear entre E_p e o pH^* no intervalo de 1,0 a 9,0, acima deste valor verifica-se que os valores de E_p tornam-se praticamente constantes. Os valores de i_p permanecem praticamente inalterados até o pH^* de 9,0 e a partir deste valor sofrem uma acentuada diminuição, assumindo o formato de uma curva de dissociação, o que indica que a etapa determinante da velocidade do processo eletrodico é precedida por um equilíbrio ácido-base [78]. Foi observada uma dependência linear entre E_p e pH^* no intervalo de 1,0 a 9,0 de acordo com a equação: E_p (V) = $-0,21 - 0,054 \text{ pH}^*$, com coeficiente de correlação linear igual a $-0,9986$. Esta dependência linear é consequência direta de uma relação Nernstiniana, na qual o potencial depende de um termo que é o produto de uma constante e do logaritmo da atividade do íon hidrogênio [79].

La Scalea et al. [52] encontraram uma dependência linear entre E_p e pH^* nesta mesma região de pH^* para a redução eletroquímica do metronidazol, processo que envolve a redução do grupo nitro. Os autores estudaram a redução deste fármaco na mistura dimetilformamida:tampão B.R., entretanto, neste trabalho foi observado que a redução eletroquímica do metronidazol origina dois picos voltamétricos, um de caráter reversível envolvendo um elétron, correspondendo a redução do grupo nitro ao correspondente ânion-radical e outro de caráter irreversível envolvendo três elétrons, correspondendo a redução do ânion-radical a hidroxilamina. Assim, os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 85 mostram um comportamento distinto do observado para o metronidazol. Aparentemente, o

grupo nitro da ET é reduzido diretamente à hidroxilamina em uma única etapa envolvendo quatro elétrons.

O coeficiente angular de um gráfico de E_p vs. pH pode, a princípio, ser utilizado para se estimar o número de prótons envolvidos em um processo eletrodico. Para um sistema reversível este coeficiente angular deve ser igual a $0,059 \text{ m/n}$, onde m é o número de prótons e n o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da velocidade. O valor do coeficiente angular do gráfico de $E_p(\text{V})$ vs. pH^* foi de 54 mV , o que é próximo a 59 mV , sugerindo um processo eletrodico envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons. Este resultado é concordante com a redução do grupo nitro a hidroxilamina, processo que envolve quatro prótons e quatro elétrons. Entretanto, esta afirmação é válida somente se for considerado que todas as transferências eletrônicas envolvidas no processo eletrodico estudado sejam reversíveis. Para sistemas irreversíveis, a determinação do número de prótons envolvidos na etapa determinante é mais complexa, e segundo Elving [79], a literatura freqüentemente apresenta tais determinações realizadas de maneira questionável. A dificuldade na determinação do número de prótons envolvidos na etapa determinante para sistemas irreversíveis surge devido ao fato do coeficiente angular do gráfico de $E_p(\text{V})$ vs. pH depender de α , formalmente: $0,059 \text{ m}/\alpha n$. Para compostos orgânicos, procedimentos para a determinação de α com adequado rigor exigem uma completa elucidação da cinética eletrodica das transferências eletrônicas envolvidas no processo em estudo, ou ao menos da etapa determinante da velocidade. Assim, o coeficiente angular do gráfico de $E_p(\text{V})$ vs. pH permite a determinação do número de prótons envolvidos na etapa determinante de um processo eletrodico irreversível somente se o parâmetro α puder ser adequadamente determinado. Isto nem sempre é possível ou é realizado utilizando procedimentos demasiadamente simplificados.

Visando a obtenção de mais informações sobre a redução eletroquímica da ET em meio misto, foram registrados voltamogramas cíclicos em presença deste fármaco em diferentes velocidades de varredura nos diferentes pH^* estudados. A Figura 87 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em diferentes valores de v no pH^* 4,0, cujo comportamento é representativo do observado para os outros valores de pH^* .

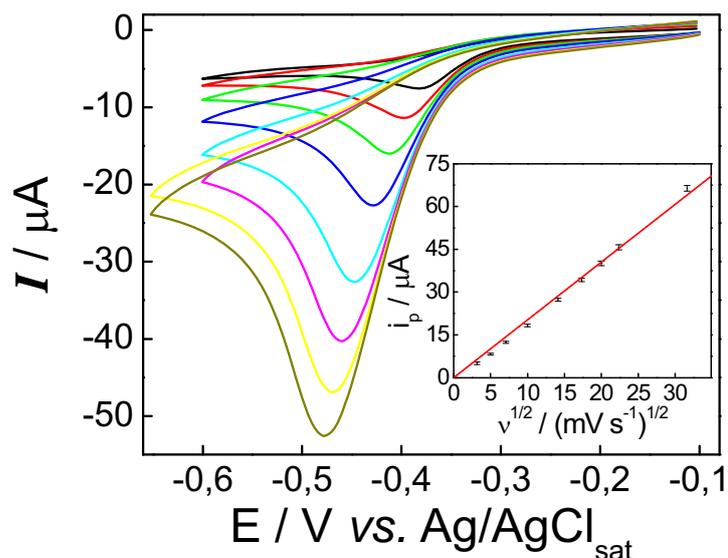


Figura 87 - Voltamogramas cíclicos registrados em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes valores de v . $\text{pH}^* = 4,0$; $C_{\text{ET}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) 10; (—) 25; (—) 50; (—) 100; (—) 200; (—) 300; (—) 400; (—) 500 mV s^{-1} . Inserido: gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$.

Foi verificada uma relação linear entre i_p e $v^{1/2}$ segundo a equação: $i_p (\mu\text{A}) = 1,67 v^{1/2} [(\text{mV s}^{-1})^{1/2}]$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9996, indicando um processo eletrodico controlado por difusão. Os parâmetros voltamétricos obtidos em diferentes velocidades de varredura no $\text{pH}^* 4,0$ são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros voltamétricos determinados para a redução eletroquímica de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v).

$v / \text{mV s}^{-1}$	$-E_{\text{pc}} (\text{V})$	$i_{\text{pc}} (\mu\text{A})$	$i_{\text{pc}}/v^{1/2} (\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})^{1/2})$
10	0,381	5,1	1,60
25	0,396	8,2	1,65
50	0,411	12,4	1,75
100	0,430	18,3	1,83
200	0,448	27,3	1,93
300	0,460	34,2	1,98
400	0,469	40,1	2,00
500	0,478	45,7	2,04
1000	0,506	66,4	2,10

A Tabela 13 mostra uma dependência da função corrente com v , indicando a ocorrência de reações químicas acopladas às etapas eletroquímicas, o que é concordante com as sucessivas reações de protonação envolvidas na redução eletroquímica do grupo nitro em meio prótico. Verifica-se que os valores de E_p se deslocam para valores mais negativos com o aumento de v , o que é um comportamento típico de um processo eletrodico irreversível ou de processo envolvendo uma etapa do tipo E_rC_i [60,61].

A variação do coeficiente angular do gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$ em função do pH^* também foi estudada. A Figura 88 apresenta os gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ obtidos para $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em diferentes pH^* .

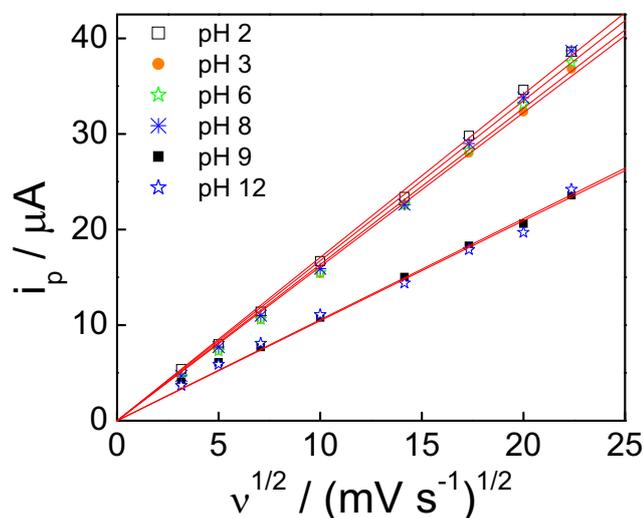


Figura 88 - Gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ obtidos a partir de voltamogramas cíclicos registrados em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ET na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) em diferentes pH^* .

A Figura 88 mostra que o coeficiente angular do gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$ permanece constante na região de 1,0 a 8,0, sofrendo uma diminuição para maiores valores de pH^* . Estes resultados sugerem que o número de elétrons transferidos na redução eletroquímica da ET sofre variações com o pH^* , assumindo que este parâmetro não influencie significativamente o coeficiente de difusão da ET. No intervalo de pH^* de 1,0 a 8,0 o coeficiente angular médio do gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$ foi de $1,65 \pm 0,04$, enquanto na região de 9,0 a 14,0 foi de $1,0 \pm 0,1$. Assim, estes valores indicam uma ligeira diminuição de n para pH^* maiores do que 8,0.

De acordo com o Esquema 10, a estabilidade do ânion-radical $R\text{-NO}_2^{\bullet-}$ em soluções aquosas deve aumentar com o aumento do pH^* , uma vez que em meio alcalino as reações de

protonação ocorrem em menor extensão. Desta forma, os voltamogramas cíclicos registrados em presença de ET em velocidades de varredura suficientemente altas e em meios suficientemente alcalinos, deveriam apresentar um pico anódico referente à re-oxidação da fração do ânion-radical que não teve tempo suficiente para sofrer as sucessivas reações de protonação. Nos estudos voltamétricos da ET em diferentes pH^* , foram registrados voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura, nos quais não foi observado pico anódico na varredura reversa para nenhum dos pH^* estudados. Entretanto, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, verificou-se um pico anódico no voltamograma reverso para valores de pH^* maiores do que 9,0, conforme apresentado na Figura 89.

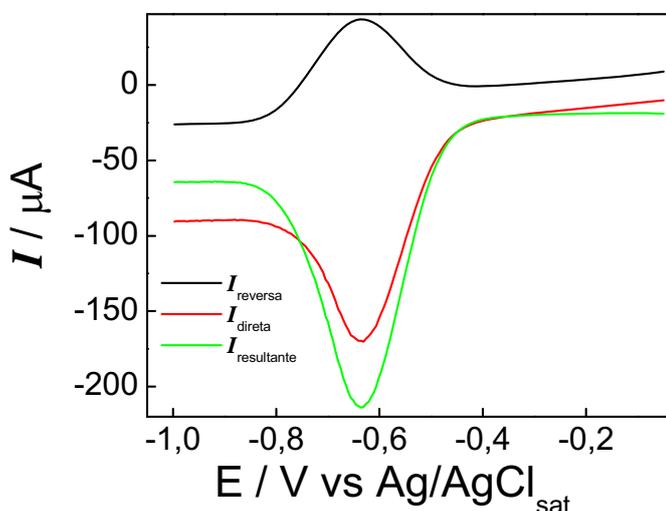


Figura 89 - Voltamograma de onda quadrada registrado na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) $\text{pH}^* = 9,0$ contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET. Condições voltamétricas: $f = 300 \text{ Hz}$, $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$.

Desta maneira, a técnica de voltametria de onda quadrada mostrou o aumento da estabilidade do ânion-radical com o aumento do pH^* , o que é concordante com a redução do grupo nitro a hidroxilamina. Para valores de pH^* menores do que 9,0 não foi observado pico anódico no voltamograma reverso mesmo utilizando altas frequências (1000 Hz), indicando que, em pH^* menores do que 9,0 as reações de protonação ocorrem em velocidades extremamente altas. Verificou-se um aumento da razão $I_{\text{reversa}}/I_{\text{direta}}$ com o aumento da frequência, sendo que esta razão se aproxima de 1,0 para altos valores de frequência e de pH^* . A variação da razão $I_{\text{reversa}}/I_{\text{direta}}$ com o aumento da frequência para diferentes valores de pH^* é apresentada na Figura 90.

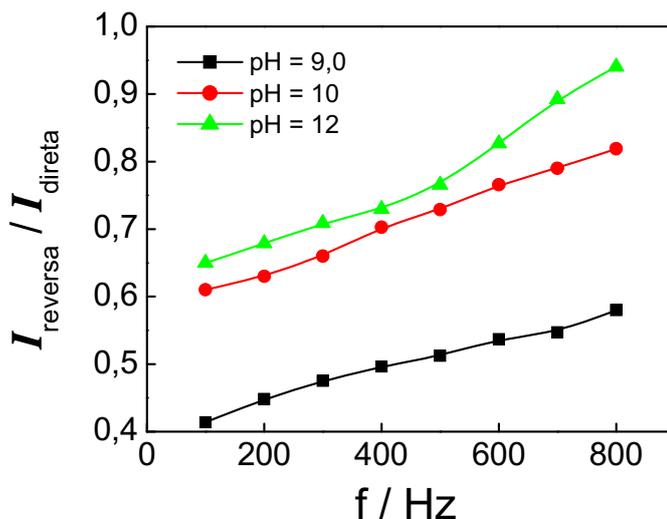


Figura 90 - Variação da razão $I_{\text{reversa}}/I_{\text{direta}}$ em função da frequência para diferentes pH*.

Em todos os pH* estudados não foram observadas variações significativas entre os valores de corrente de voltamogramas cíclicos registrados sucessivamente, indicando a ausência de processos de adsorção ou reações químicas entre a ET e seus produtos de redução. A Figura 91 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados sucessivamente em presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET em pH* 4,0; cujo comportamento é representativo do comportamento observado nos demais valores de pH*.

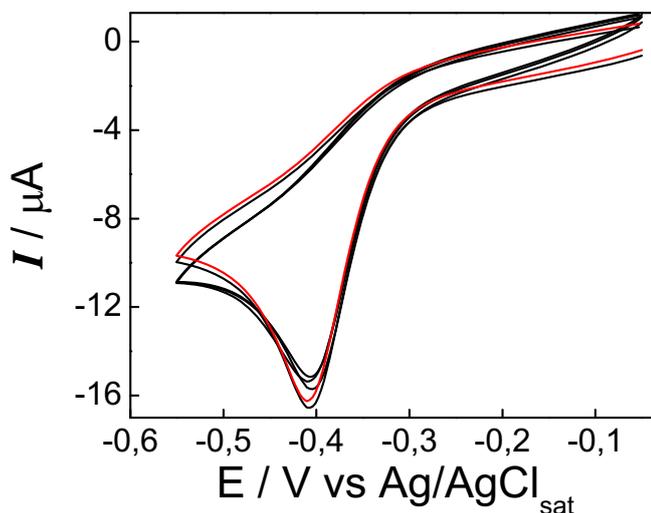


Figura 91 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0 contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Ciclos sucessivos. (—) Registrado após 30 s com fluxo de N₂ na célula eletroquímica.

O fato de ser observado apenas um pico catódico nos voltamogramas cíclicos registrados em presença de ET indica que o grupo nitro da molécula do fármaco está sendo reduzido ao grupo hidroxilamina em uma única etapa, uma vez que a redução até a amina originaria um segundo pico catódico em potenciais mais negativos [49]. Visando confirmar se o produto de redução da ET apresenta em sua estrutura o grupo hidroxilamina, foram registrados voltamogramas cíclicos nos quais o limite anódico foi estendido até valores suficientemente positivos para se observar a oxidação da hidroxilamina ao grupo nitroso. Os voltamogramas cíclicos registrados nestas condições são apresentados na Figura 92.

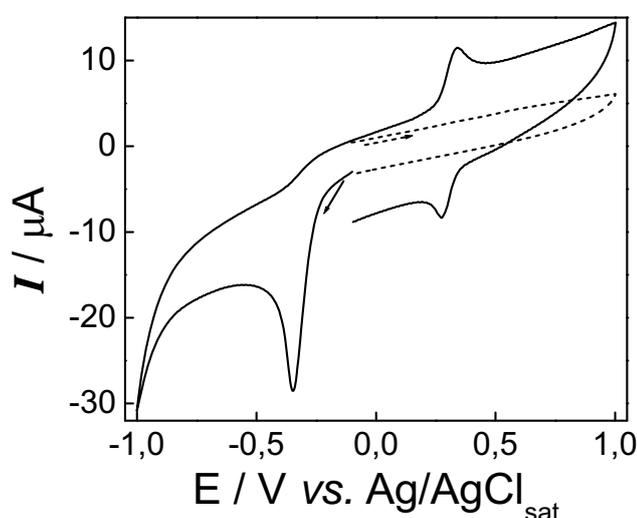


Figura 92 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0 contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ET, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Intervalo: 0,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl_{sat}. (—) Intervalo: 0,0 a -1,0 V com potencial de inversão anódico igual a +1,0 V vs. Ag/AgCl_{sat}.

A Figura 92 mostra que o voltamograma cíclico registrado em presença de ET no intervalo de 0,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl_{sat} não apresenta qualquer pico voltamétrico, indicando que o fármaco não apresenta processo de oxidação neste intervalo de potencial. Entretanto, quando o voltamograma cíclico é iniciado em 0,0 V com potencial de inversão catódico de -1,0 V vs. Ag/AgCl_{sat} com posterior varredura anódica até +1,0 V vs. Ag/AgCl_{sat} observa-se um par de picos de caráter reversível com $E_{pa} = +0,34 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{sat}$. Este resultado é concordante com a re-oxidação do grupo hidroxilamina ao grupo nitroso. Assim, o comportamento voltamétrico observado na Figura 92 indica que o grupo nitro da molécula de ET seja reduzido diretamente ao grupo hidroxilamina. Foram registrados voltamogramas cíclicos nos quais o limite anódico foi sistematicamente estendido até o início do processo de

descarga anódica do sistema solvente/eletrólito. Estes voltamogramas cíclicos não apresentaram outros picos anódicos além daquele observado na Figura 92. Este resultado também é concordante com a ausência do grupo amina no produto de redução da ET, uma vez que aminas são oxidadas entre +1,0 e +1,5 V vs. Ag/AgCl_{sat} [61].

Assim, o conjunto de resultados obtidos nos estudos voltamétricos da ET em meio misto permitem concluir que a redução eletroquímica deste fármaco na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) envolve a redução do grupo nitro a hidroxilamina.

4.3b.2 - Eletrólises a potencial controlado

Visando determinar o número de elétrons envolvidos no processo de redução eletroquímica da ET em meio misto, foram realizadas eletrólises a potencial controlado em pH* 4,0. Estas eletrólises foram realizadas aplicando-se -0,65 V vs. Ag/AgCl_{sat}, sendo eletrolisados 15 mL de uma solução 2,0 mmol L⁻¹ de ET. As eletrólises foram realizadas em triplicata, sendo as curvas amperométricas obtidas apresentadas na Figura 93.

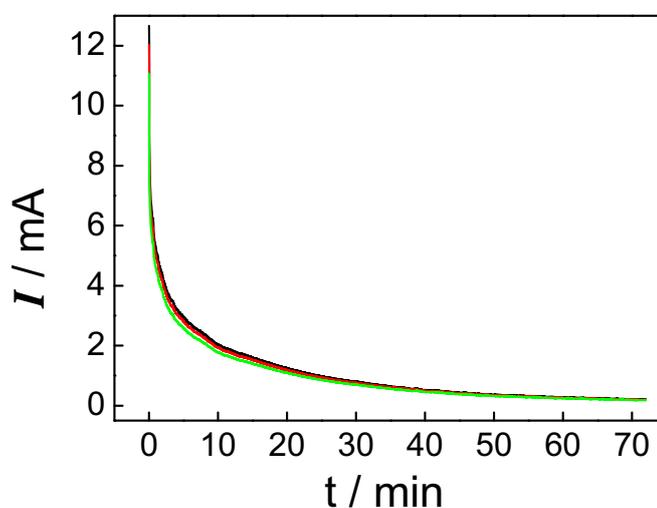


Figura 93 - Curvas amperométricas obtidas para as eletrólises de 2,0 mmol L⁻¹ de ET em meio da mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0. E = -0,65 V vs. Ag/AgCl_{sat}. V_{eletrolisado} = 15 mL. Eletrodo de trabalho: placa de carbono vítreo com 2 x 2 cm.

A integração das curvas amperométricas apresentadas na Figura 93 forneceram um valor médio de carga, já descontada a carga residual, de $11,6 \pm 0,5$ C, o que corresponde a um

número de elétrons transferidos por mol de ET igual a $4,0 \pm 0,2$. Este resultado é concordante com a redução do grupo nitro ao grupo hidroxilamina.

Verificou-se, após a realização das eletrólises, o completo desaparecimento do pico relativo à redução da ET, confirmando que todo o fármaco foi consumido durante a eletrólise. Antes e após as eletrólises da ET em meio misto, foram registrados voltamogramas cíclicos estendendo-se o limite anódico. Estes voltamogramas são apresentados na Figura 94.

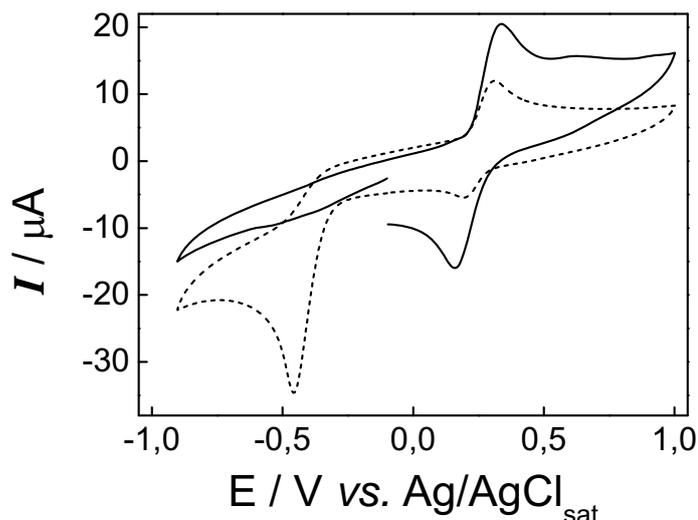


Figura 94 - Voltamogramas cíclicos registrados na mistura ACN:tampão B.R. (40:60 v/v) pH* 4,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (---) Antes da eletrólise; $C_{ET} = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (—) Após a eletrólise.

A Figura 94 mostra que após a eletrólise observa-se um pronunciado aumento dos valores de i_p do par de picos associado à oxidação da hidroxilamina. Novamente foram registrados voltamogramas cíclicos cujos potenciais de inversão anódico foram sistematicamente estendidos. Nestes voltamogramas não foram observados novos picos anódicos, indicando que também em condições de eletrólise o grupo nitro da ET não é reduzido a amina.

Assim, o estudo da redução eletroquímica da ET em meio misto demonstrou que a redução do fármaco envolve a redução do grupo nitro ao grupo hidroxilamina em um processo envolvendo quatro elétrons. Não foram encontradas evidências da redução do grupo nitro a amina, ou da quebra redutiva das ligações C-Cl da molécula de ET. Provavelmente estes processos ocorrem em potenciais muito negativos, os quais não são acessíveis devido à limitada janela útil de potencial apresentada pela mistura ACN:tampão B.R..

Não foram realizados estudos de identificação dos produtos de eletrólise da ET em meio misto devido à dificuldade da eliminação da água do meio reacional. Além disso, a redução eletroquímica da ET em meio misto ocorre de maneira muito similar ao observado em ACN contendo doador de prótons, condição esta cujos produtos eletrogerados foram submetidos a estudos de identificação.

4.3b.3 - Métodos eletroanalíticos para a determinação da ET

Os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da ET em meio misto foram realizados em pH* 4,0 utilizando as técnicas de LSV, DPV e SWV. Nestes estudos, empregou-se a mesma metodologia adotada para as outras dicloroacetamidas estudadas. Apesar dos resultados analíticos satisfatórios obtidos para a ET em ACN, a utilização de um meio misto ACN:água apresenta algumas vantagens que tornariam os métodos voltamétricos ainda mais atrativos para a quantificação da ET. Além de diminuir a quantidade de ACN, a qual apresenta alta toxicidade e um custo relativamente alto, a utilização do meio misto tornaria os métodos voltamétricos ainda mais sensíveis, uma vez que neste meio a redução do grupo nitro envolve quatro elétrons e não apenas um como observado em ACN.

Previamente à construção das curvas analíticas, foi realizado um estudo de otimização de todos os parâmetros operacionais envolvidos nas técnicas voltamétricas avaliadas. Assim, foram obtidos os seguintes parâmetros otimizados: para a LSV: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; para a DPV: $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $t_p = 10 \text{ ms}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; para a SWV: $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$. Os parâmetros analíticos obtidos nas condições otimizadas para cada uma das técnicas voltamétricas estudadas são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros analíticos obtidos com as técnicas LSV, DPV e SWV para a determinação de ET em meio misto.

Técnica	Equação da reta, $i_p / \mu\text{A}$ e $C_{\text{ET}} / \text{mol L}^{-1}$	L.R.* $/ \mu\text{mol L}^{-1}$	S $/ \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$	LD $/ \text{mol L}^{-1}$	Detectabilidade $/ \text{mol L}^{-1}$
LSV	$i_p = 0,03 + 4,4 \times 10^4 C_{\text{ET}}$, R = 0,9998	10 – 100	$4,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
DPV	$i_p = 0,01 + 1,2 \times 10^5 C_{\text{ET}}$, R = 0,9991	1,0 – 100	$1,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
SWV	$i_p = 0,02 + 1,2 \times 10^5 C_{\text{ET}}$, R = 0,9992	7,5 – 100	$1,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-6}$

*L.R. – Intervalo linear.

A Tabela 14 mostra que as técnicas voltamétricas apresentaram parâmetros analíticos muito promissores para a determinação de ET em formulações farmacêuticas. A técnica de DPV foi a que apresentou os melhores valores de S e LD superando até mesmo a técnica de SWV. Novamente a detectabilidade encontrada é coincidente com o primeiro ponto da curva analítica para todas as técnicas voltamétricas estudadas. O desempenho analítico da técnica de SWV é prejudicado, pois, nas condições experimentais adotadas o produto eletrogerado é rapidamente consumido por reações de protonação, conseqüentemente, não há contribuição da corrente reversa para a corrente resultante. Verifica-se que, de modo geral, os parâmetros analíticos obtidos em meio misto são superiores ao obtidos em meio aprótico (Tabela 11).

A maior sensibilidade das técnicas voltamétricas em meio misto é uma conseqüência direta do maior número de elétrons envolvidos no processo eletródico no qual se baseia a detecção. Em meio misto ocorre a redução do grupo nitro a hidroxilamina, envolvendo quatro elétrons, enquanto em meio de ACN a redução do grupo nitro envolve apenas um elétron gerando o ânion-radical. É interessante observar, entretanto, que a técnica de SWV apresentou maior sensibilidade e menor LD em ACN. Isto pode ser atribuído às diferenças no processo de redução da ET em ACN e em meio misto. Em ACN, o grupo nitro sofre uma redução reversível sem reações químicas acopladas. Nestas condições, o estudo de otimização dos parâmetros mostrou que elevadas velocidades de varredura podem ser empregadas sem perda de definição ou intensidade do sinal voltamétrico. Assim, em ACN foi possível utilizar uma velocidade de varredura de $1,2 \text{ V s}^{-1}$ ($f = 300 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$). Em meio misto, o aumento

de f prejudicou o perfil voltamétrico da ET, além promover apenas um ligeiro aumento nos valores de corrente.

Desta forma, em meio misto, o estudo de otimização de parâmetros mostrou que a máxima velocidade de varredura que pode ser empregada sem prejudicar o perfil e intensidade do sinal voltamétrico foi de 400 mV s^{-1} ($f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$). Assim, o melhor desempenho da técnica de SWV em ACN deve-se à maior velocidade de varredura empregada, o que compensa o menor número de elétrons envolvidos na redução da ET neste meio. Em meio misto, as sucessivas reações químicas acopladas impedem que elevadas velocidades de varredura sejam empregadas. Assim, utilizando a técnica de SWV em altas frequências em meio misto, provavelmente, não há tempo para que todas as reações de protonação ocorram, fazendo com que a frequência não tenha um efeito expressivo sobre a intensidade do sinal voltamétrico.

Na discussão da Figura 89, afirmou-se que as reações de protonação ocorrem em velocidades extremamente altas para pH^* menores do que 9,0, pois nesta situação não se observa um pico anódico no voltamograma reverso. Entretanto, é importante ressaltar que para não se verificar o pico anódico no voltamograma reverso basta que a primeira reação de protonação seja rápida, enquanto que para a SWV apresentar um ganho de sensibilidade devido ao maior número de elétrons é necessário que todas as reações de protonação ocorram em velocidades extremamente altas.

As técnicas voltamétricas estudadas foram empregadas para a determinação de ET em uma formulação farmacêutica comercial, cuja concentração nominal de ET é de 500 mg por comprimido. Para a determinação de ET na formulação farmacêutica, cinco comprimidos foram macerados, sendo o sólido resultante dissolvido em ACN/TBABF₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e submetido à análise empregando-se o método de adição de padrão. Foi observado que as curvas voltamétricas registradas em presença da amostra comercial foram idênticas àsquelas registradas em presença do padrão de ET. Este comportamento mostra que os excipientes presentes na formulação farmacêutica não interferem significativamente na determinação voltamétrica da ET. Para cada técnica utilizada foram realizadas cinco determinações a fim de se avaliar a repetitividade dos métodos voltamétricos desenvolvidos. Foram obtidas as seguintes equações de reta para as curvas de adição de padrão: para LSV $i_p (\mu\text{A}) = 0,92 + 4,5 \times 10^4 C_{\text{ET}} (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,9996;

para DPV i_p (μA) = $2,8 + 1,4 \times 10^5 C_{\text{ET}}$ (mol L^{-1}) com coeficiente de correlação linear igual a 0,9995; para SWV i_p (μA) = $2,7 + 1,3 \times 10^5 C_{\text{ET}}$ (mol L^{-1}) com coeficiente de correlação linear igual a 0,9994. As equações de reta obtidas mostram que os valores de S das curvas de adição de padrão foram muito próximos aos valores obtidos para as curvas analíticas, indicando que a formulação farmacêutica é isenta de efeitos de matriz. Os resultados da determinação de ET no medicamento comercial são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados da determinação de ET na formulação farmacêutica comercial e dos estudos de adição e recuperação utilizando os diferentes métodos eletroanalíticos desenvolvidos em meio misto.

Técnica	Encontrado ^a mg / comprimido	Adicionado / mol L ⁻¹	Recuperado /mol L ⁻¹	t ^b	Recuperação / %
LSV	493 ± 12	5,00 x 10 ⁻⁵	(4,97 ± 0,04) x 10 ⁻⁵	1,7	99 ± 3
DPV	505 ± 8	1,00 x 10 ⁻⁵	(1,02 ± 0,03) x 10 ⁻⁵	1,5	101 ± 4
SWV	497 ± 11	1,00 x 10 ⁻⁵	(1,04 ± 0,06) x 10 ⁻⁵	1,5	103 ± 5

^aMédia de cinco determinações. ^bt_{crítico} = 2,78 (P = 0,05, 4 graus de liberdade) [76]. Teste-t corresponde à comparação estatística entre os valores adicionados vs. recuperados.

A Tabela 15 mostra que os teores de ET determinados foram muito próximos ao conteúdo nominal do fármaco na formulação farmacêutica para todas as técnicas voltamétricas estudadas. Este resultado indica que a amostra comercial encontra-se dentro das especificações em relação ao teor do princípio ativo. As porcentagens de recuperação foram próximas a 100 % para todas as técnicas voltamétricas estudadas, indicando a validade destas técnicas para a quantificação da ET nesta formulação farmacêutica. Os desvios padrão relativos dos valores recuperados variaram entre 0,8 e 6,0 % para os diferentes métodos desenvolvidos, indicando que estes apresentam uma repetitividade bastante adequada. A comparação estatística pelo teste-t entre os teores adicionados e recuperados revelou que não existem diferenças estatísticas entre estes teores para nenhum dos métodos voltamétricos desenvolvidos, uma vez que em nenhuma situação os valores de t excederam o valor crítico. Este resultado mostra também que não são encontradas evidências da presença de erros sistemáticos nos resultados obtidos pelos métodos voltamétricos desenvolvidos. Este conjunto de resultados mostra que as técnicas voltamétricas podem ser empregadas com êxito na

determinação de ET nesta formulação farmacêutica utilizando um meio misto como solução de leitura.

Os resultados da determinação de ET na formulação farmacêutica utilizando meio misto foram praticamente os mesmos que os obtidos em meio de ACN, não existindo diferenças estatísticas entre ambos os conjuntos de resultados. Isto ocorre devido à alta concentração de ET na amostra de modo que, apesar da sensibilidade obtida para as técnicas voltamétricas em ACN ser menor do que a obtida em meio misto ela ainda é suficiente para a determinação de ET na amostra comercial. Entretanto, a utilização do meio misto apresenta algumas vantagens, como reduzir a quantidade de ACN. Além disso, em meio misto, a redução do grupo nitro ocorre em potenciais menos negativos do que em meio de ACN, o que melhora a seletividade do método. Assim, o conjunto de resultados obtidos mostraram que a determinação de ET em formulações farmacêuticas pode ser realizado com êxito empregando a mistura ACN:tampão B.R..

5 - Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a redução eletroquímica de todas as dicloroacetamidas estudadas envolve a quebra de suas ligações C-Cl. Verificou-se que este processo origina picos voltamétricos entre $-1,8$ e $-2,2$ V *vs.* Ag/AgCl_{sat} para as diferentes dicloroacetamidas avaliadas. Assim, o FD apresentou um pico voltamétrico de caráter composto em $-2,0$ V *vs.* Ag/AgCl_{sat}, o qual provavelmente está associado a quebra consecutiva das duas ligações C-Cl do fármaco. O TEC apresentou dois picos voltamétricos em $-1,8$ e $-2,2$ V *vs.* Ag/AgCl_{sat}. Para a ET, além de um pico voltamétrico em $-1,8$ V *vs.* Ag/AgCl_{sat} relativo à quebra de suas ligações C-Cl, observou-se também um par de picos relativo à redução de seu grupo nitro. Na presença de um doador de prótons, foi observado que o grupo nitro da ET é reduzido a hidroxilamina em uma única etapa envolvendo quatro elétrons.

Verificou-se que as etapas envolvidas na quebra redutiva das ligações C-Cl diferem ligeiramente de uma dicloroacetamida para outra. Assim, para o FD e para a ET observou-se que a quebra de cada ligação C-Cl envolve a transferência de dois elétrons, sugerindo a redução dos radicais eletrogerados aos respectivos carbânions. Para o TEC foi observado que a quebra de cada uma de suas ligações C-Cl envolve a transferência de apenas um elétron. Este resultado sugere que o radical formado após a quebra das ligações C-Cl sofre uma série de reações químicas, as quais não permitem que estes radicais sejam reduzidos aos correspondentes carbânions. Na presença de um doador de prótons, verificou-se que os radicais eletrogerados na redução do TEC sofrem exclusivamente reações de hidrogenação, sendo verificado que seu primeiro pico voltamétrico reduz seus grupos CHCl₂ a CH₂Cl, enquanto o segundo pico promove a redução dos grupos CH₂Cl a CH₃. Outra diferença observada na quebra redutiva das ligações C-Cl das dicloroacetamidas foi o fato da redução eletroquímica do FD envolver pelo menos uma transferência eletrônica reversível, sugerindo uma quebra seqüencial, enquanto nenhuma reversibilidade foi detectada para o TEC e para a ET, sugerindo que a quebra das ligações C-Cl destes compostos ocorrem conjuntamente às transferências eletrônicas.

Do ponto de vista analítico, verificou-se que todas as metodologias eletroanalíticas desenvolvidas se mostraram apropriadas para a quantificação das dicloroacetamidas. Embora os métodos voltamétricos não tenham sido aplicados para a determinação de FD em uma amostra real, os parâmetros analíticos obtidos sugerem que estes são potencialmente aplicáveis para a determinação de FD em formulações farmacêuticas. O desempenho analítico

da técnica de SWV para a determinação de FD foi similar ao de outros métodos propostos na literatura para a quantificação deste fármaco. Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para o TEC e para a ET foram empregados com êxito para a determinação destes fármacos em formulações farmacêuticas. Verificou-se que os excipientes destas amostras não interferem na determinação das dicloroacetamidas pelos métodos eletroanalíticos desenvolvidos, o que dispensou etapas de pré-tratamento da amostra. Assim, os métodos desenvolvidos permitiram a determinação do TEC e da ET em formulações farmacêuticas de maneira rápida, simples e com um custo instrumental relativamente baixo.

6 - Referências

-
- 1 CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; MARTINS, F. S. V. Infecção por helmintos e enteroprotzoários, documento elaborado pelo Centro de Informação em Saúde para Viajantes, UFRJ, 2000. Disponível em: <<http://www.cives.ufrj.br/informes/helmintos/>>. Acesso em: 22 jun. 2007.

 - 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION, Entamoeba taxonomy. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 75, n. 3, p. 291-292, 1997.

 - 3 ACKERS, J. P.; MIRELMAN, D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 9, n. 4, p. 367-373, Aug. 2006.

 - 4 STANLEY, S. L. Jr. Amoebiasis. **Lancet**, London, v. 361, n. 9362, p. 1025-1034, Mar. 2003.

 - 5 PARASITES and health – amebiasis. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Amebiasis.htm>>. Acesso em: 22 junho 2007.

 - 6 AMATO, V. N.; BALDY, J. L. S. **Doenças transmissíveis**: compêndio didático. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 431 p.

 - 7 WRIGHT, S. Amoebiasis and giardiasis. **Medicine**, New York, v. 33, n. 8, p. 47-50, Aug. 2005.

 - 8 CLARK, C. G. The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 151, n. 8, p. 599-603, Oct. 2000.

 - 9 HAQUE, R.; NEVILLE, L. M.; WOOD, S.; PETRI, W. A. J. Short report: detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* directly in stool. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Mclean, v. 50, n. 5, p. 595-596, May 1994.

 - 10 CALDERARO, A.; GORRINI, C.; BOMMEZZADRI, S.; PICCOLO, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 100, n. 5, p. 450-457, May 2006.

 - 11 REYNOLDS, J. E. F. **Martindale the extra pharmacopeia**. 28th ed. Londres: The Pharmaceutical Press, 1982. p. 968-984.

 - 12 KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Agentes antiprotozoários. In: _____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap. 29, p. 507-513.

13 REYNOLDS, J. E. F. **Martindale the extra pharmacopeia**. 31th ed. Londres: The Pharmaceutical Press, 1996. p. 972-988.

14 NCAULEY, J. B.; HERWALDT, B. L.; STOKES, S. L.; BECHER, J. A.; ROBERTS, J. M.; MICHELSON, M. K.; JURANEK, D. D. Diloxanide furoate for treating asymptomatic *Entamoeba histolytica* cyst passers: 14 years' experience in the united states. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 15, n. 3 p. 464-468, Sept. 1992.

15 GOODMAN, A.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **The pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. New York: Pergamon, 1991. p. 1002-1005.

16 BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2001. v. 1, p. 583-583.

17 THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 28. 28th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p. 581.

18 AL-GHANAM, S. M.; BELAL, F. Spectrophotometric determination of diloxanide furoate in its dosage forms. **IL Farmaco**, Lausanne, v. 56, n. 9, p. 677-681, Sept. 2001.

19 DAABEES, H. G. The use of derivative spectrophotometry for the determination of acyclovir and diloxanide furoate in presence of impurity or degradation product. **Anal. Lett.**, New York, v. 31, n. 9, p. 1509-1522, 1998.

20 PRASAD, C. V. N.; SRIPRIYA, V.; SAHA, R. N.; PARIMOO, P. Simultaneous determination of tinidazole, furazolidone and diloxanide furoate in a combined tablet preparation by second-derivative spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 961-968, Dec. 1999.

21 PARIMOO, P.; PRASAD, C. V. N.; GAUTAM, A. Simultaneous quantitative determination of metronidazole and diloxanide furoate in a tablet preparation by difference spectroscopy. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 231-234, May 1996.

22 MOHAMED, M. Y.; EL-GENDY, A. E.; EL-BARDICY, M. G.; TAWAKKOL, M. S.; AHMAD, A. K. S. Flow injection analysis of pharmaceutical compounds – determination of some anthelmintic and antiprotozoal compounds. **Spectrosc. Lett.**, New York, v. 29, n. 2, p. 299-319, 1996.

23 EL-GIZAWY, S. M. HPLC analysis of metronidazole and diloxanide furoate in its dosage forms. **Anal. Lett.**, New York, v. 28, n. 1, p. 83-92, 1995.

24 HASAN, N. Y.; ELKAWY, M. A.; ELZEANY, B. E.; WAGIEH, N. E. Stability indicating methods for the determination of diloxanide furoate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 187-197, Apr. 2002.

25 BHOIR, I. C.; RAMAN, B.; SUNDARESAN, M.; BHAGWAT, A. M. Separation and estimation of diloxanide furoate and metronidazole in solid dosage form using packed column supercritical fluid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 354, n. 1/3, p. 123-128, Nov. 1997.

26 MISHAL, A.; SOBER, D. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of metronidazole benzoate and diloxanide furoate as bulk drug and in suspension dosage form. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 39, n. 3/4, p. 819-823, Sept. 2005.

27 SANTOS, A. L.; TAKEUCHI, R. M.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical reduction and voltammetric determination of diloxanide furoate in non-aqueous medium. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 16, n. 6, p. 922-927, Sept./Oct. 2005.

28 ÖZKAN, S. A.; USLU, B.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, Boca Raton, v. 33, n. 3, p. 155-181, 2003.

29 EL-MAALI, N. A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 64, n. 1, p. 99-107, Aug. 2004.

30 PETERS, D. G. Halogenated organic compounds. In: LUND, H.; HAMMERICH, O. **Organic electrochemistry**. 4th ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 8, p. 341-377.

31 CLEARY, J. A.; MUBARAK, M. S.; VIEIRA, K. L.; ANDERSON, M. R.; PETERS, D. G. Electrochemical reduction of alkyl-halides at vitreous carbon cathodes in dimethylformamide. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 198, n. 1, p. 107-124, Jan. 1986.

32 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. -M.; SU, K. B. Kinetics of dissociative electron transfer. Direct and mediated electrochemical reductive cleavage of the carbon-halogen bond. **J. Phys. Chem.**, Washington, v. 90, n. 16, p. 3815-3823, July 1986.

33 ANTONELLO, S.; CRISMA, M.; FORMAGGIO, F.; MORETTO, A.; TADDEI, F.; TONIOLO, C.; MARAN, F. Insights into the free-energy dependence of intramolecular dissociative electron transfers. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 124, n. 38, p. 11503-11513, Sept. 2002.

34 COSTENTIN, C.; ROBERT, M.; SAVEÁNT, J. -M. Electron transfer and bond breaking: recent advances. **Chem. Phys.**, Amsterdam, v. 324, n. 1, p. 40-56, May 2006.

-
- 35 PRASAD, M. A.; SANGARANARAYANAN, M. V. Evidence for the formation of radical anion in the reductive cleavage of carbon-bromide bond in 4'-bromomethylbiphenyl-2-carbonitrile. **Chem. Phys. Lett.**, Amsterdam, v. 414, n. 1/3, p. 55-60, Oct. 2005.
- 36 PRASAD, M. A.; SANGARANARAYANAN, M. V. Electrochemical reductive cleavage of carbon tetrachloride in aqueous-nonaqueous binary solvents. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 569, n. 1, p. 127-134, July 2004.
- 37 PRASAD, M. A.; SANGARANARAYANAN, M. V. Distinction between stepwise and concerted mechanisms in reductive cleavage reactions - use of voltammetric current function in the analysis of non-linear kinetic laws. **Tetrahedron**, Oxford, v. 61, n. 7, p. 1785-1791, Feb. 2005.
- 38 JAWORSKI, J. S.; CEMBOR, M.; KUCK, D. Reductive bond cleavage of chloro-substituted 10-methyl-tribenzotriquinacenes: transition between concerted and stepwise mechanisms. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 51, n. 27, p. 6069-6075, Aug. 2006.
- 39 ANTONELLO, S.; MARAN, F. The role and relevance of the transfer coefficient α in the study of dissociative electron transfers: concepts and examples from the electroreduction of perbenzoates. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 121, n. 41, p. 9668-9676, Oct. 1999.
- 40 BATANERO, B.; ELINSON, M. N.; BARBA, F. Electrochemical dimerization of phenacyl bromides N-acylhydrazones - a new way to 1-N-acylamino-2,5-diaryl-pyrroles. **Tetrahedron**, Oxford, v. 60, n. 47, p. 10787-10792, Nov. 2004.
- 41 BATANERO, B.; BARBA, F. A new proposed mechanism for the cathodic reduction of a carbon-chlorine bond in 2-acetylphenyltrichloroacetate. **Electrochem. Commun.**, New York, v. 3, n. 11, p. 595-598, Nov. 2001.
- 42 DIRLAM, J. P.; EBERSON, L.; CASANOVA, J. Electroreduction of α, α' -dibromoketones. 2,4-dibromo-2,4-dimethyl-3-pentanone. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 94, n. 1, p. 240-245, Jan. 1972.
- 43 FRY, A. J.; O'DEA, J. J. Electrochemical Reduction of α, α' -dibromo-ketones in acetic acid a convenient synthetic route to highly branched α -acetoxy ketones. **J. Org. Chem.**, Washington, v. 40, n. 25, p. 3625-3631, 1975.
- 44 FRY, A. J.; ANDERSON, J. T. Electrochemical Reduction of bis(α -bromocyclopropyl)ketone. **J. Org. Chem.**, Washington, v. 46, n. 7, p. 1490-1492, 1981.

45 CASADEI, M. A.; DI RENZO, B.; INESI, A.; MORACCI, F. M. Electrochemical studies on haloamides. Part 3: haloacetamides and haloacetohydroxamates. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, Cambridge, v. 1, n. 3, p. 375-378, Feb. 1992.

46 COSTENTIN, C.; LOUAULT, C.; ROBERT, M.; TEILLOUT, A.-L. Sticky dissociative electron transfer to polychloroacetamides. In-cage ion-dipole interaction control through the dipole moment and intramolecular hydrogen bond. **J. Phys. Chem. A**, Washington, v. 109, n. 12, p. 2984-2990, Mar. 2005.

47 ISSE, A. A.; DE GIUSTI, A.; GENNARO, A.; FALCIOLA, L.; MUSSINI, P. R. Electrochemical reduction of benzyl halides at a silver electrode. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 51, n. 23, p. 4956-4964, June 2006.

48 SANECKI, P. T.; SKITAL, P. M. The electroreduction of alkyl iodides and polyiodides the kinetic model of EC(C)E and ECE-EC(C)E mechanisms with included transfer coefficient variability. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 52, n. 14, p. 4675-4684, Apr. 2007.

49 LUND, H. Cathodic reduction of nitro and related compounds. In: LUND, H.; HAMMERICH, O. **Organic electrochemistry**. 4th ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 9, p. 379-409.

50 ZUMAN, P.; FIJALEK, Z. Contribution to the understanding of the reduction mechanism of nitrobenzene. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 296, n. 2, p. 583-588, Dec. 1990.

51 BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I.; LA-SCALEA, M. A. Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, Lausanne, v. 42, n. 2, p. 175-178, May 1997.

52 LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. Voltammetric behavior of metronidazole at mercury electrodes. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 127-135, Mar./Apr. 1999.

53 LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, E. I.; BRETT, A. M. O. Voltammetric behavior of benzimidazole at a DNA-electrochemical biosensor. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 561-568, July 2002.

54 ZUMAN, P.; FIJALEK, Z. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds. Part VI: polarographic, voltammetric and controlled potential reduction of ortho-nitrobenzaldehyde anthranil. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 5, n. 1, p. 53-64, Jan. 1993.

55 ZUMAN, P.; FIJALEK, Z.; DUMANOVIC, D.; SUZNJEVIC, D. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds. Part I: general mechanistic aspects. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 4, n. 8, p. 783-794, Sept. 1992.

56 ZUMAN, P.; FIJALEK, Z. Reaction of electrogenerated arylhydroxylamines and nitrosobenzene in the course of reduction of nitrobenzene under conditions of cyclic voltammetry. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 296, n. 2, p. 589-593, Dec. 1990.

57 BOLLO, S.; FINGER, S.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy studies of the heterogeneous electron transfer reaction of some nitrosoaromatic compounds. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 52, n. 15, p. 4892-4898, Apr. 2007.

58 LUND, H. On the electrochemistry of 2,4,6-triphenylnitrobenzene and related compounds. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 272-277, Jan. 2007.

59 WAGENKNECHT, J. H.; EBERSON, L.; UTLEY, J. H. P. Carboxylic acids and derivatives. In: LUND, H.; HAMMERICH, O. **Organic electrochemistry**. 4th ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 12, p. 463-466.

60 NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography: single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible and kinetic systems. **Anal. Chem.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 706-723, Apr. 1964.

61 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 831 p.

62 GONZÁLEZ-VELASCO, J. The linear sweep voltammetric method: an application to the study of reversible and irreversible processes. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 6, n. 9, p. 711-724, Sept. 1994.

63 OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry. **Anal. Chem.**, Washington, v. 57, n. 1, p. 101A-110A, Jan. 1985.

64 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998. cap. 4, p. 136-203.

65 BRUGEL, W. **Nuclear magnetic resonance spectra and structure**. New York: Academic Press, 1967. v. 1, p. 107-110.

66 POUCHERT, C. J. **The Aldrich library of NMR spectra**. 2nd ed. Wisconsin: Aldrich Chemical Company Inc., 1983. v. 2, p. 460.

67 GADKARIEM, E. A.; BELAL, F.; ABOUNASSIF, M. A.; EL-OBEID, H. A.; IBRAHIM, K. E. E. Stability studies on diloxanide furoate: effect of pH, temperature, gastric and intestinal fluids. **IL Farmaco**, Lausanne, v. 59, n. 4, p. 323-329, Apr. 2004.

68 SILVESTER, D. S.; WAIN, A. J.; ALDOUS, L.; HARDACRE, C.; COMPTON, R. G. Electrochemical reduction of nitrobenzene and 4-nitrophenol in the room temperature ionic liquid [C4dmim][N(Tf)₂]. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 596, n. 2, p. 131-140, Nov. 2006.

69 LEDNECZKI, I.; FORGO, P.; KISS, J. T.; MOLNÁR, A.; PÁLINKÓ, I. Conformational behaviour of acetamide derivatives studied by NMR spectroscopic and computational methods. **J. Mol. Struct.**, Istambul, v. 834-835, n. 27, p. 349-354, May 2007.

70 KONING, C. B.; VAN OTTERLO, W. A. L.; MICHAEL, J. P. Amide rotamers of N-acetyl-1,3-dimethyltetrahydroisoquinolines: synthesis, variable temperature NMR spectroscopy and molecular modeling. **Tetrahedron**, Oxford, v. 59, n. 42, p. 8337-8345, Oct. 2003.

71 ELVING, P. J.; TANG, C. -S. Polarographic behavior of organic compounds III. The chloroacetic acids. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 72, n. 7, p. 3244-3246, 1950.

72 SANTOS, A. L.; TAKEUCHI, R. M.; MARIOTTI, M. P.; OLIVEIRA, M. F.; ZANONI, M. V. B.; STRADIOTTO, N. R. Study of electrochemical oxidation and determination of albendazole using a glassy carbon-rotating disk electrode. **IL Farmaco**, Lausanne, v. 60, n. 8, p. 671-674, Aug. 2005.

73 MARCOLINO, L. H. Jr.; BERGAMINI, M. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; CAVALHEIRO, E. T. G.; FATIBELLO FILHO, O. Flow injection amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode. **IL Farmaco**, Lausanne, v. 58, n. 5, p. 999-1004, Apr. 2003.

74 BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 39, n. 1/2, p. 54-59, Sept. 2005.

75 BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 315-319, Jan. 2007.

76 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Significance tests. In: _____. **Statistics for analytical chemistry**. 3th ed. New York: Ellis Horwood Limited, 1993. cap. 3, p. 53-60.

77 KWIAŃEK, B.; KALINOWSKI, M. Effect of benzoic acid on the cathodic reduction of aromatic nitro compounds in N,N-dimethylformamide. **Electrochim. Acta**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 399-402, Feb. 1990.

78 ZUMAN, P. The effects of acidity and chemical reactions accompanying the electrode process proper. In: _____. **The elucidation of organic electrode processes**. New York: Academic Press, 1969. cap. 2, p. 20-71.

79 ELVING, P. J. Variation of the half-potential of organic compounds with pH. **Pure Appl. Chem.**, v. 7, n. 6, p. 423-454, 1963.