

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RITA DE CÁSSIA MENDES DE BARROS

**Mecanismo de oxidação eletroquímica
e determinação analítica de primaquina –
algumas aplicações de eletrodos
de diamante dopado com boro**

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Helena Pires Serrano

São Paulo

10/07/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RITA DE CÁSSIA MENDES DE BARROS

**Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação
analítica de primaquina – algumas aplicações
de eletrodos de diamante dopado com boro**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para ob-
tenção do Título de Doutora em Química
(Química Analítica)*

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Helena Pires Serrano

São Paulo
2007

Rita de Cássia Mendes de Barros

**Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina
– algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para ob-
tenção do Título de Doutora em Química
(Química Analítica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sílvia Helena Pires Serrano

Instituição: Instituto de Química – Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____


Assinatura: _____

Dedico
ao meu pai
e a todos que também “viajaram ao encontro do sol”
e olham por mim

Ofereço
à minha mãe,
família,
e amigos

Agradeço, demais da conta ...

- à Sílvia, minha orientadora, à qual rendo dois agradecimentos. Um como aluna, por todas as valiosas discussões, pela presença incansável, pelas dicas e sugestões, pelo meu crescimento acadêmico. E outro como ser humano, pelos ensinamentos, mesmo que involuntários, sobretudo pela confiança e amizade. Sílvia não é uma pessoa que se encontra em qualquer esquina, pela vida afora.
- e muito especialmente, à Nita (IQ) e ao Koshun (ITA), meu orientador do mestrado. São também desta estirpe de pessoas únicas.
- à Profa. Dra. Elizabeth Brotto, por me abrir as portas da docência.
- à Dra. Neidenêi G. Ferreira, do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, pelos filmes de diamante, pelas tardes de discussão de trabalhos em sua casa, por fazer parte da minha vida acadêmica há tanto tempo. Igualmente ao Prof. Dr. Evaldo Corat, INPE, meu co-orientador de mestrado, por filmes de diamante e utilização de equipamentos de caracterização.
- à Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, FCF-USP, pela doação da primaquina usada na tese.
- ao Laboratório Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, na pessoa da Dra. Shirley Trajano, pela doação dos comprimidos de primaquina usados na tese.
- à Profa. Dra. Ohara Augusto e ao Prof. Dr. João Valdir Comasseto, IQ-USP, pela doação de reagentes usados na tese.
- aos Profs. Drs. Richard Compton, Oxford University, e Wilhelm Baader e Paulo Teng, IQ-USP, pelas importantes discussões.
- ao Prof. Dr. Pascoal Senise, IQ-USP, pela ajuda na participação no Seminário de Tese.
- à Profa. Dra. Nina Coichev, IQ-USP, pela discussão de apresentação oral para congresso internacional.
- ao Prof. Dr. Bayardo Torres, pelos preciosos ensinamentos didáticos.
- a todos os professores do Instituto de Química que colaboraram com minha formação acadêmica.
- ao pessoal querido do laboratório, William, Murilo, Robinho, Fávero, as meninas da Iniciação, pela convivência, risadas, papos, almoços, cafês.
- à minha cara aluna Carol, pelo resultado extremamente gratificante de seu trabalho de Iniciação, por corroborar minha opção de “ensinar”.
- às funcionárias Cristina, pela assessoria completa e irrestrita no laboratório, e Lúcia, por não me deixar sem café ao longo destes anos.
- ao pessoal dos laboratórios vizinhos, da própria Química Analítica, e de outros mais distantes, por colaborações e troca de vivências.
- a todos os funcionários do IQ que colaboraram de alguma forma com a realização desta tese.
- ao CNPq pela bolsa no início do doutorado.
- à FAPESP pelo apoio financeiro através do Projeto Temático N° 2001/01192-3.



“Atenta para as sutilezas
que não se dão em palavras.
Compreende o que não se deixa
capturar pelo entendimento.

Dentro do coração empedernido do homem
arde o fogo que derrete o véu de cima abaixo.

Desfeito o véu,
o coração descobre as histórias do Hidir
e todo o saber que vem de nós.

A antiga história de amor
entre a alma e o coração
regressa sempre
em vestes renovadas.

Ao recitares “sol”
contempla o sol.
Sempre que recitares “não sou”,
contempla a fonte do que és.”

Este mundo que vemos, ouvimos e tocamos é a condensação divina, acessível aos sentidos humanos, das duas forças prodigiosas do Universo.

Uma delas, que desce, busca dissipar-se, imobilizar-se, morrer. A outra, que sobe, almeja a liberdade e a imortalidade.

Os dois exércitos, o obscuro e o luminoso, os exércitos da vida e da morte entrecrocaram-se perpetuamente. Os sinais visíveis para nós deste entrecrocamento são as coisas, as plantas, os animais e os homens.

Perpetuamente as duas forças antagônicas se embatem, unem-se, pelejam, vencem e são vencidas, reconciliam-se e tornam a guerrear-se por todo o Universo – desde o invisível torvelinho de uma gota d'água até a infinita torrente de astros da Galáxia. O mais humilde dos insetos e a mais simples das idéias são fortalezas de Deus. Dentro deles, Deus está preparado para a batalha decisiva.

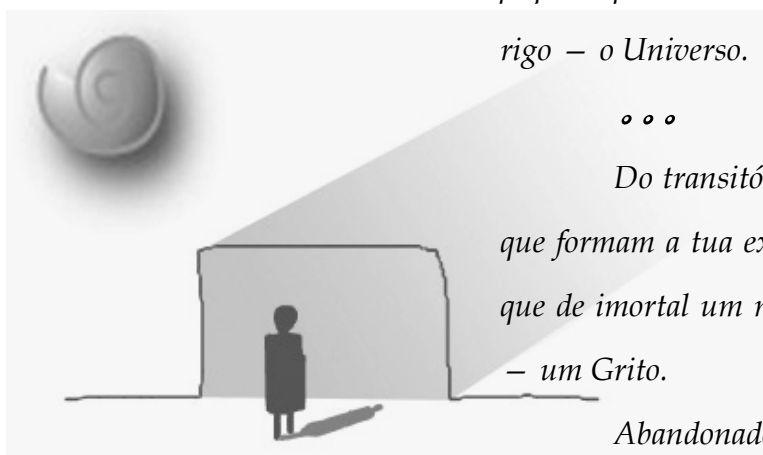
• • •

Somos um. Do verme cego nas profundezas do oceano até a infinda arena da Galáxia, um mesmo ser luta e corre perigo – nós próprios. E em nosso pequeno peito terreno, um mesmo ser luta e corre perigo – o Universo.

• • •

Do transitório choque de forças antagônicas que formam a tua existência, empenha-te em criar o que de imortal um mortal pode criar neste universo – um Grito.

Abandonado à terra o corpo que o gerou, esse Grito se lança pela eternidade afora.



VILAREJO

(Marisa Monte / Pedro Baby /
Carlínhos Brown / Arnaldo Antunes)

Há um vilarejo ali

Onde areja um vento bom
Na varanda, quem descansa
Vê o horizonte deitar no chão
Pra acalmar o coração

Lá o mundo tem razão

Terra de heróis, lares de mãe
Paraíso se mudou para lá
Por cima das casas, cal


Frutas em qualquer quintal
Peitos fartos, filhos fortes
Sonho semeando o mundo real
Toda gente cabe lá
Palestina, Shangri-Lá

Vem andar e voa
Vem andar e voa
Vem andar e voa

Lá o tempo espera
Lá é primavera
Portas e janelas ficam sempre abertas
Pra sorte entrar
Em todas as mesas, pão

Flores enfeitando
Os caminhos, os vestidos, os destinos
E essa canção
Tem um verdadeiro amor
Para quando você for

Vem andar e voa
Vem andar e voa



Este **VILAREJO** existe,
e se chama **ALAGOA**,
em Minas Gerais,
a terra de meu pai.
Esta Defesa de Tese só tem
sentido pela existência
daqueles lugares e pessoas...

RESUMO

Barros, R.C.M. **Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina – algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro.** 2007. 150 p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A primaquina (PQ), um derivado 8-aminoquinolínico [8-(4-amino-1-metilbutilamino)-6-metoxiquinolina], é um fármaco normalmente usado contra a malária, mas tem sido também empregado no tratamento da doença de Chagas, agindo, muito eficazmente, como agente tripanomicida, por intermédio de seus metabólitos. O metabólito 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ), formado pela oxidação da primaquina dentro do organismo humano, foi identificado em fluídos biológicos e é considerado o principal produto com ação citotóxica sobre o *Trypanosoma cruzi*. Técnicas eletroquímicas foram empregadas para estudar o mecanismo de oxidação da PQ *in vitro* na tentativa de correlacionar os resultados obtidos, com os dados disponíveis de estudos *in vivo*. Utilizou-se eletrodo de carbono vítreo (ECV) e diferentes tipos de técnicas, como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria, trabalhando-se em meio aquoso, tampão Britton-Robson, pH 7,40, para determinação do número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação. O mecanismo eletroquímico de oxidação da PQ, envolveu a perda de 1 elétron em um processo irreversível, registrado em $E_{pa,1}$ a +0,788 V, resultando na formação de cátion radical durante a primeira varredura no sentido positivo de potencial. Após a inversão da varredura de potencial, registrou-se um pico catódico, $E_{pc,1}$ a -0,160 V, dependente do processo principal. Voltamogramas cíclicos realizados em meio não aquoso, indicaram que a etapa eletroquímica inicial é seguida de uma etapa química envolvendo a captura nucleofílica do cátion radical. No segundo ciclo de varredura, registrou-se um segundo pico anódico, $E_{pa,2}$, a -0,079 V, componente anódico de $E_{pc,1}$. Assim, um novo par redox passou a ser observado, dependente da oxidação primária da PQ, mas registrado em potencial muito menos positivo do que a oxidação da PQ, composto de partida. Este novo processo redox, típico do par quinona/hidroquinona, está envolvido em vários outros processos descritos na literatura, e pressupõe que, após a captura nucleofílica do cátion radical, ocorra outra etapa eletroquímica, no potencial aplicado, envolvendo a perda de 3 elétrons e 3 prótons, com formação de uma quinona-imina. A subsequente hidrólise da imina produz o derivado quinoidal e diamina primária. Voltamogramas cíclicos registrados em solução de 5-HPQ e *m*-anisidina, confirmaram o mecanismo proposto. Devido à ausência de fenômenos de adsorção, utilizou-se com sucesso o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), no formato plano, para a determinação analítica de PQ em formulação farmacêutica comercial, empregando-se a voltametria de pulso diferencial. Enquanto o ECV foi mais efetivo para a proposição do mecanismo, principalmente devido às características de adsorção superficial, o EDDB permitiu o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de PQ, devido à ausência de adsorção superficial.

Palavras-chave: primaquina, mecanismo de oxidação, eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de diamante dopado com boro, voltametria, cronoamperometria.

ABSTRACT

Barros, R.C.M. **Electrochemical oxidation mechanism and analytical determination of primaquine – some boron doped diamond electrode applications**. 2007. 150 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Primaquine (PQ), an 8-aminoquinolinic compound, is the clinical drug of choice for the radical cure of relapsing malaria. This drug has also been being used against the Chagas disease, acting very efficiently, through their metabolites, which present trypanosomicide action. The metabolite 5-hydroxyprimaquine (5-HPQ) was identified in human biological fluids, during *in vivo* studies, as the main oxidation product of PQ, with cytotoxic action against *Trypanosoma cruzi*. Electrochemical techniques were used to study, *in vitro*, the PQ oxidation redox mechanism and the goal was to try correlating the electrochemical data to the biological information, previously reported. Glassy carbon electrode (GCE) associated to cyclic and differential pulse voltammetry and chronoamperometry in aqueous media, pH 7.40, were used to determine the number of electrons involved in the determinant step of PQ electrochemical oxidation. The primary oxidation of PQ involved the loss of 1 electron in an irreversible process recorded at $E_{pa,1} = +0,788$ V, to produce a cation radical, during the first anodic scan. Reverting the potential sweeping a cathodic peak, $E_{pc,1}$, was recorded at $-0,160$ V, which was dependent of $E_{pa,1}$. Cyclic voltammograms recorded in DMF showed that the initial electrochemical step is followed by a chemical reaction involving the nucleophilic capture of the cation radical. During the second scan, a new anodic peak ($E_{pa,2}$) was recorded at $-0,079$ V and corresponds to the anodic component of $E_{pc,1}$. Therefore a new redox couple, recorded at less positive potential than the PQ oxidation was always observed and shows similar characteristics to those observed for quinone/hydroquinone redox couple, which is involved in several other electrochemical processes described in the literature. The process presupposes that the nucleophilic capture of the cation radical is followed by another electrochemical step involving the loss of 3 electrons and 3 protons to produce a quinone-imine structure. The further imine hydrolysis produces the quinoidal compound and primary diamine. The proposed mechanism was confirmed by the cyclic voltammograms recorded in 5-HPQ solutions as well as in the solutions of similar compound such as *m*-anisidine. PQ was determined in commercial pharmaceutical formulations by using differential pulse voltammetry at boron doped diamond electrode (BDDE) associated to the standard addition method. While the GCE was more effective for the mechanism proposition, mainly due its superficial adsorption characteristics, the BDDE, due low superficial adsorptive effects, permitted the development of analytical method for the PQ quantification.

Keywords: primaquine, oxidation mechanism, glassy carbon electrode, boron doped diamond electrode, voltammetry, chronoamperometry.

LISTA DE FIGURAS

- Esquema 1: Reações propostas para oxidação da primaquina. H_2PQ , $HPQ^{\cdot-}$ e QI são o metabólito hidroxilado, a semiquinona-imina e a quinona-imina, respectivamente. Ref. 23 37
- Esquema 2: Oxidação eletroquímica da PQ, originando um cátion radical 97
- Esquema 3: Captura nucleofílica do cátion radical, com conseqüente hidroxilação da molécula de PQ e formação dos híbridos de ressonância 98
- Esquema 4: 2ª etapa eletroquímica de oxidação da PQ, com formação de um composto quinonaimínico 99
- Esquema 5: Hidrólise da imina, com formação do respectivo derivado quinoidal e de 1,4-pentanodiamina 101
- Esquema 6: Formação do par redox do derivado quinoidal/hidroquinoidal da PQ 103
- Figura 1: Estrutura da molécula de primaquina, com a respectiva numeração da cadeia quinolínica 24
- Figura 2: Distribuição geográfica da malária ao redor do mundo, em 2003. Fonte: **ref. 7** 25
- Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium*, parasito causador da malária. São conhecidos aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium*, os quais infectam várias espécies de vertebrados. 4 deles infectam seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Fonte: **ref. 7** 27
- Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas. Fonte: **ref. 7** 28

Figura 5: Estruturas das moléculas dos metabólitos mais conhecidos da primaquina.....	31
Figura 6: Estrutura das moléculas dos metabólitos considerados por Strother <i>et al.</i> [17], além dos 4 apresentados na Figura 5, exceto a CPQ.....	33
Figura 7: Voltamograma cíclico obtido em plasma humano saudável. Janela de potencial – 0,3 a 1,3 V. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Velocidade de varredura, 100 mV/s. Sob permissão da Elsevier [29]	44
Figura 8: Voltamogramas cíclicos obtidos de pacientes com leucemia, antes e depois de receber tratamento de irradiação, previamente a transplante de medula. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Janela de potencial: -0,3 a 1,3 V. Velocidade de varredura, 100 mV/s. O plasma foi coletado em heparina. Sob permissão da Elsevier [30]	45
Figura 9: Voltamograma cíclico obtido em solução de 5-HPQ (254 µM) em meio desaerado, pH 7,4, temperatura ambiente. Eletrodo de trabalho: pasta de carbono; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Velocidade de varredura, 150 mV/s. Sob permissão da American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (Aspet) [25]	47
Figura 10: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura, mostrando à esquerda a superfície de um filme de diamante dopado com boro crescido sobre silício, e à direita a lateral do mesmo tipo de filme com sua espessura	63/64
Figura 11: Esquema de montagem do eletrodo de diamante	65

- Figura 12: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura, mostrando acima um filme de diamante dopado com boro crescido sobre substrato esférico de molibdênio, e abaixo o substrato usado no crescimento, onde nota-se uma parte da haste, com comprimento total de aproximadamente 2 cm..... 66
- Figura 13: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson; pH 2,15, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, - - - - - : 1ª varredura; ——— : 3ª varredura; - ● - ● - ● - : branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras. 76
- Figura 14: Variação de corrente de pico de oxidação da PQ ($I_{pa,1}$) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15..... 78
- Figura 15: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, - - - - - : 1ª varredura, ——— : 3ª varredura, - ● - ● - ● - : branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras 80
- Figura 16: Variação da corrente de pico, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40..... 81
- Figura 17: Variação da corrente de pico, $I_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40..... 81

- Figura 18: Variação da função de corrente de pico, $I_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40. Dados referentes à Figura 16. 82
- Figura 19: Variação do potencial de pico, $E_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pHs 2,15 (dados referentes à Tabela 2, pág. 77) e 7,40 (dados referentes à Tabela 3, pág. 83). Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} 84
- Figura 20: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, — — — — — : antes, e ——— : depois de 20 ciclos em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ 85
- Figura 21: Variação do potencial de pico de redução, $E_{pc,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, em pH 2,15 e 7,40. Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} 86
- Figura 22: Variação do potencial de pico de oxidação, $E_{pa,2}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, em pH 2,15 e 7,40. Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} 86
- Figura 23: Variações do logaritmo das correntes de pico, $I_{pc,1}$ e $I_{pa,2}$, em função do logaritmo da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com eletrodo de carbono vítreo, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40 87

- Figura 24: Variação da corrente de pico de redução do par redox, $I_{pc,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40. ECV limpo: eletrodo polido e lavado antes de cada leitura; ECV não lavado: leituras sucessivas, sem limpeza; ECV modificado: eletrodo submetido a 60 ciclos em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, antes das leituras sucessivas, sem limpeza 89
- Figura 25: Voltamogramas cíclicos registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. A linha na região de corrente zero refere-se ao branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras 90
- Figura 26: Voltamogramas cíclicos registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. A linha na região de corrente zero refere-se ao branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras 91
- Figura 27: Variação de corrente de pico de oxidação da PQ ($I_{pa,1}$) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15 92
- Figura 28: Variação da função de corrente do pico de oxidação, $I_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15 (A) e pH 7,40 (B)..... 93

- Figura 29: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de 1,5-dihidroxi-naftaleno, sobre eletrodo de pasta de carbono, com hidroxilação anódica. A: 1,5-dihidroxi-naftaleno em HClO₄ 2 M. B: 1,4,5-trihidroxi-naftaleno. Sob permissão da American Chemical Society [77] 94
- Figura 30: Voltamogramas cíclicos registrados em solução de oxina (a) e 1,4-naftoquinona (b). ECV, tampão acetato pH 6, $v = 200 \text{ mVs}^{-1}$. Par redox P3/P3', $\sim -0,17 / -0,05 \text{ V}$. Sob permissão de Wiley VCH Verlag [79] 95
- Figura 31: Voltamogramas cíclicos registrados em benzeno. ECV, H₂SO₄ 0,5 M, diferentes v . Par redox em $\sim +0,65 / +0,75 \text{ V}$. Sob permissão de Springer (Kluwer) [80] 95
- Figura 32: Esquema de oxidação de benzeno, com formação de cátion radical, com perda de 1 elétron, e posterior captura nucleofílica do cátion, por água, para gerar um composto hidroxilado. Sob permissão de Wiley VCH Verlag [81] 96
- Figura 33: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de PQ 1,0 mmolL⁻¹, 60^a varredura; **(a)** e 5-HPQ 1,0 mmolL⁻¹, 3^a varredura; **(b)**, em solução tampão BR **(c)**, pH 7,40. 100
- Figura 34: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de PQ 1,0 mmolL⁻¹ em DMF, com TBATFB/ 0,2 molL⁻¹ como eletrólito suporte. Velocidades de varredura: **(a)** 40 mVs⁻¹, **(b)** 80 mVs⁻¹, e **(c)** 100 mVs⁻¹. **(d)**: branco. 102
- Figura 35: Estrutura da molécula de *m*-anisidina 103
- Figura 36: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de *m*-anisidina 1,0 mmolL⁻¹, e PQ 1,0 mmolL⁻¹, em solução tampão BR. pH 2,15 **(A)**, pH 7,40 **(B)**. 1^a varredura **(a)**, 3^a varredura **(b)**, e PQ **(c)**, 3^a varredura 104

Figura 37: Variação da razão $I_d,t/I_{d,ss}$ em função de $t^{-1/2}$. Dados obtidos com μ ECV (área $9,50 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$), em solução de PQ $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão BR, pH 7,40. Número de pulsos de potencial: 2; nível 1: potencial 0 V, duração 2 s, tempo de amostragem 0,01 s; nível 2: potencial 0,62 V, duração 5 s, tempo de amostragem 0,01 s. $I_{d,ss} = (1,03 \pm 3,2 \times 10^{-4}) + (0,067 \pm 1,6 \times 10^{-4})t^{-1/2} \text{ (s}^{-1/2}\text{)}$.
 $R = 0,9999$; $P < 0,0001$ 106

Figura 38: Voltamogramas de pulso diferencial, registrados com ECV, solução de pH 7,40, PQ $0,01 \text{ mmolL}^{-1}$, $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$; 1ª varredura (**a**), 2ª varredura (**b**), e 6ª varredura (**c**). Condições experimentais: amplitude de pulso: 0,06 V; intervalo de pulso: 1 s; tempo de equilíbrio: 25 s; $E_i = +0,4 \text{ V}$; $E_f = +1,0 \text{ V}$ 107

Figura 39: voltamogramas de pulso diferencial, registrados com EDDB, solução de pH 7,40, PQ $0,01 \text{ mmolL}^{-1}$, $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$; 1ª e 3ª varreduras. Condições experimentais: amplitude de pulso: 0,06 V; intervalo de pulso: 1 s; tempo de equilíbrio: 25 s; $E_i = +0,4 \text{ V}$; $E_f = +1,0 \text{ V}$ 108

Figura 40: Variação da corrente de pico principal da PQ, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos dos voltamogramas registrados com ECV (área $3,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$), em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução de tampão BR pH 2,15. Valor de D_{PQ} : $5,37 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Equação de reta: $I_{pa,1} = (5,47 \times 10^{-6} \pm 1,23 \times 10^{-6}) + (5,67 \times 10^{-5} \pm 2,18 \times 10^{-6})v^{1/2}$. $R = 0,9957$; $P < 0,0001$. Eletrodo limpo entre as varreduras..... 109

Figura 41: Variação da corrente de pico principal da PQ, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos dos voltamogramas registrados com μ ECV, em solução de PQ $0,05 \text{ mmolL}^{-1}$, em meio aprótico de DMF / TBATFB. Valor de D_{PQ} : $1,60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Equação de reta: $I_{pa,1} = (8,35 \times 10^{-8} \pm 1,63 \times 10^{-7}) + (3,11 \times 10^{-5} \pm 7,40 \times 10^{-7})v^{1/2}$. $R = 0,998$; $P < 0,0001$. Eletrodo limpo entre as varreduras..... 109

Figura 42: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB, em solução de PQ 0,01 mmolL⁻¹, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. **(a)** 1ª varredura; **(b)** 2ª varredura, sem limpeza do eletrodo; **(c)** 3ª varredura, após agitação da solução; **(d)** branco. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; E_i = 0,4 V; E_f = 1,0 V; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V 111

Figura 43: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com ECV, em solução de PQ 0,01 mmolL⁻¹, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. **(a)** 1ª varredura; **(b)** 2ª varredura, sem limpeza do eletrodo; **(c)** 3ª varredura, após agitação da solução; **(d)** branco. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; E_i = 0,4 V; E_f = 1,0 V; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V 112

Figura 44: Curva analítica obtida a partir dos voltamogramas de pulso diferencial, registrados com EDDB em soluções padrão de PQ, em tampão BR, pH 2,15. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; E_i = 0,4 V; E_f = 1,0 V; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V. $(8,0 \times 10^{-7} \leq [\text{PQ}] \leq 1,5 \times 10^{-5}) \text{ molL}^{-1}$. Equação de reta: $I_p = (-1,4 \times 10^{-13} \pm 0,16 \times 10^{-14}) \text{ A} + (9,6 \times 10^{-3} \pm 0,062 \times 10^{-3}) \text{ molL}^{-1} \text{ PQ} \dots\dots\dots 113$

Figura 45: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB, em solução amostra de PQ, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15, antes e após adições sucessivas de PQ: 1 = 2,3 μmolL⁻¹; 2 = 2,5 μmolL⁻¹; 3 = 2,6 μmolL⁻¹; 4 = 2,7 μmolL⁻¹; 5 = 2,8 μmolL⁻¹; 6 = 2,9 μmolL⁻¹; 7 = 3,0 μmolL⁻¹; 8 = 3,1 μmolL⁻¹; 9 = 3,2 μmolL⁻¹; 10 = 3,3 μmolL⁻¹; 11 = 3,4 μmolL⁻¹. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; E_i = 0,4 V; E_f = 1,0 V; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V 114

Figura 46: Curvas analíticas obtidas a partir do método de adição de padrão, com extrapolação, para 3 amostras diferentes. Dados obtidos de voltamogramas de pulso diferencial registrados em soluções com adições sucessivas de PQ, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V. **A**: $I_p = (1,3 \times 10^{-8} \pm 2,5 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (6,2 \times 10^{-3} \pm 2,9 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$; **B**: $(1,3 \times 10^{-8} \pm 3,5 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (5,8 \times 10^{-3} \pm 4,2 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$; **C**: $(1,3 \times 10^{-8} \pm 2,6 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (5,9 \times 10^{-3} \pm 3,1 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$ 115

Figura 47: Variação da corrente de pico, I_p , em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos com EEDDB, em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte: lavando-se o EEDDB entre cada variação de v (\circ); na ausência de lavagem (\blacksquare) 116

Figura 48: Variação da corrente de pico, I_p , em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos com EDDB (eletrodo plano), em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte: lavando-se o EDDB entre cada variação de v (\circ); na ausência de lavagem (\blacksquare) 117

Figura 49: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura, mostrando os buracos presentes no filme de diamante crescido sobre broca de molibdênio, para formar o eletrodo esférico de diamante dopado 119

Figura 50: Voltamogramas cíclicos apresentados em densidade de corrente de pico, registrados em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ desaerada, contendo nitrato de potássio $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. **(a)** eletrodo de carbono vítreo; **(b)** EEDDB; **(c)** EDDB. Os valores para o ECV foram divididos por um fator de 2 para se ajustar na mesma escala 120

Figura 51: Variação de ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$) em função da velocidade de varredura, em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, contendo nitrato de potássio $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte. ▲: ECV; ●: EDDB; ■: EEDDB. Eletrodos lavados entre as medidas 121

Figura 52: Voltamogramas cíclicos apresentados em densidade de corrente de pico, registrados em solução desaeurada de eletrólito suporte KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. (a) ECV; (b) EDDB; (c) EEDDB..... 122

Figura 53: Valores de capacitância obtidos dos voltamogramas cíclicos em função do potencial aplicado. (a) EDDB; (b) EEDDB; (c) ECV 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades de diferentes materiais de carbono usados na fabricação de eletrodos	50
Tabela 2.	Varição nos potenciais e correntes de pico correspondentes ao processo de oxidação da PQ, em ECV, pH 2,15, como função da velocidade de varredura	77
Tabela 3.	Varição nos potenciais e correntes de pico correspondentes ao processo de oxidação da PQ, em ECV, pH 7,40, como função da velocidade de varredura	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-H-6-DPQ – 5-hidroxidesmetilprimaquina

5-HPQ – 5-hidroxiprimaquina

AA – ácido ascórbico

AU – ácido úrico

BR – solução tampão Britton-Robinson

CPQ – carboxiprimaquina

CVD – do inglês *chemical vapor deposition*, deposição química a partir da fase vapor

DHAQ – 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina

ECV – eletrodo de carbono vítreo

μ ECV – microeletrodo de carbono vítreo

EDDB – eletrodo de diamante dopado com boro (plano)

EEDDB – eletrodo esférico de diamante dopado com boro

Epa – potencial de pico anódico

Epc – potencial de pico catódico

ERO – espécies reativas de oxigênio

G6PD – enzima glicose 6-fosfatodesidrogenase

Ipa – corrente de pico anódica

Ipc – corrente de pico catódica

MAQ – 6-metoxi-8-aminoquinolina

MetHb – metemoglobina

PQ – primaquina

TBATFB – tetra-*n*-butilamônio tetrafluoroborato

VC – voltametria cíclica

VPD – voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Primaquina e doenças tropicais – malária e doença de Chagas.....	24
1.2. Metabolismo e mecanismo de ação da primaquina.....	29
1.3. Mecanismos de óxido-redução e técnicas voltamétricas.....	41
1.4. Eletrodos de trabalho: carbono vítreo e diamante dopado com boro	48
2. OBJETIVOS	54
3. PARTE EXPERIMENTAL	58
3.1. Material.....	59
3.2. Equipamentos e sistema de eletrodos	61
3.3. Procedimentos experimentais	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Comportamento eletroquímico da primaquina registrado com eletrodos de carbono vítreo e diamante dopado com boro.....	75
4.2. Mecanismo de oxidação eletroquímica da primaquina	94
4.3. Determinação analítica de primaquina com eletrodo de diamante dopado com boro	110
4.4. Emprego de eletrodo esférico de diamante dopado com boro.....	116
5. CONCLUSÕES	124
5.1. Avaliação dos resultados obtidos	125
5.2. Perspectivas futuras	133
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

1. INTRODUÇÃO

1.1. Primaquina e doenças tropicais – malária e doença de Chagas

Esta tese de doutorado insere-se dentro de um Projeto Temático Fapesp de estudo da doença de Chagas, coordenado pela Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Portanto, os estudos realizados intencionaram agregar conhecimento ao campo de pesquisa de novos medicamentos que combatam eficazmente, com mais baixo custo e menor incidência de efeitos colaterais, a doença de Chagas. Esta área da ciência desperta pouco interesse de grandes empresas farmacêuticas, por ser de ocorrência majoritária em regiões do Terceiro Mundo. Desta forma, pouco se investe na pesquisa destes medicamentos, já que espera-se apenas um pequeno retorno financeiro. Assim é que se torna imprescindível que os próprios países afetados por tais doenças, gerem grupos de pesquisa voltados para tal enfoque.

Com este intuito, o fármaco selecionado para este estudo foi a primaquina (PQ), um derivado 8-aminoquinolínico, de nome 8-(4-amino-1-metilbutilamino)-6-metoxiquinolína, cuja estrutura pode ser vista na Figura 1. Levou-se em consideração para tal escolha, os resultados prévios de avaliação *in vitro* feita com a PQ pura e em formulações de pró-fármacos, no laboratório da FCF/USP [1-3].

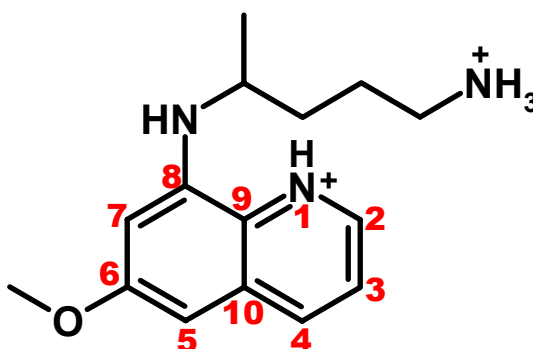


Figura 1: Estrutura da molécula de primaquina, com a respectiva numeração da cadeia quinolínica.

A PQ foi sintetizada pela primeira vez nos Estados Unidos, durante a 2ª Guerra Mundial, como parte do esforço em se obter um fármaco contra a malária, doença de grande incidência na região do Pacífico. A PQ é uma molécula derivada da pamaquina, 8-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-6-metóxiquinolina, o primeiro derivado 8-aminoquinolínico a ser produzido em laboratório, durante os esforços iniciais de desenvolvimento de fármacos contra malária, na década de 1920, na Alemanha [4]. Muitos compostos foram testados na época, mas a PQ e também a isopentaquina mostraram eficiência superior aos demais, no ataque aos parasitos. Tornou-se disponível às tropas norte-americanas durante a Guerra da Coréia [5,6], sendo introduzida definitivamente como fármaco antimalárico em 1952.

A PQ é usada principalmente contra malária, ao redor do mundo, agindo sobre vários estágios do parasito *Plasmodium*, causador da doença, e constitui arma importante contra a malária recidivante, causada por *Plasmodium vivax* e *P. ovale*. A distribuição geográfica da malária pode ser vista na Figura 2, mostrando os países endêmicos.



Figura 2: Distribuição geográfica da malária ao redor do mundo, em 2003. Fonte: **ref. 7**.

A Figura 3 apresenta um esquema do ciclo de vida do *Plasmodium* em seres humanos. O estágio que ocorre no fígado é causado por *P. vivax* e *P. ovale*, e é responsável pelo que se chama de malária recorrente [4-6]. O mosquito anófeles infectado inocula esporozoítos no hospedeiro humano (**1**). Os esporozoítos infectam células do fígado (**2**) e se transformam em esquizontes (**3**), os quais se rompem e liberam merozoítos (**4**). Em *P. vivax* e *P. ovale*, um estágio inativo, os hipnozoítos, podem persistir no fígado e causar reincidência ao invadir a corrente sanguínea semanas, ou mesmo anos, mais tarde. Após esta replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica - **A**), os parasitos sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica - **B**). Merozoítos infectam as células vermelhas (**5**). O estágio de trofozoítos sofre maturação a esquizontes, os quais se rompem, liberando merozoítos (**6**). Alguns parasitos se diferenciam em estágios eritrocíticos sexuais (gametócitos) (**7**). Os parasitos no estágio sanguíneo são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Os gametócitos, masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos), são ingeridos por um outro mosquito anófeles, durante uma picada (**8**). A multiplicação do parasito no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico (**C**). Enquanto estão no estômago do parasito, os microgametas penetram nos macrogametas, gerando os zigotos (**9**). Estes zigotos se tornam móveis e alongados (oocinetes) (**10**), e invadem a parede do intestino do mosquito, onde eles se desenvolvem a oócitos (**11**). Os oócitos crescem, se rompem e liberam esporozoítos (**12**), os quais se dirigem para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua assim o ciclo da malária. (**1**) [7].

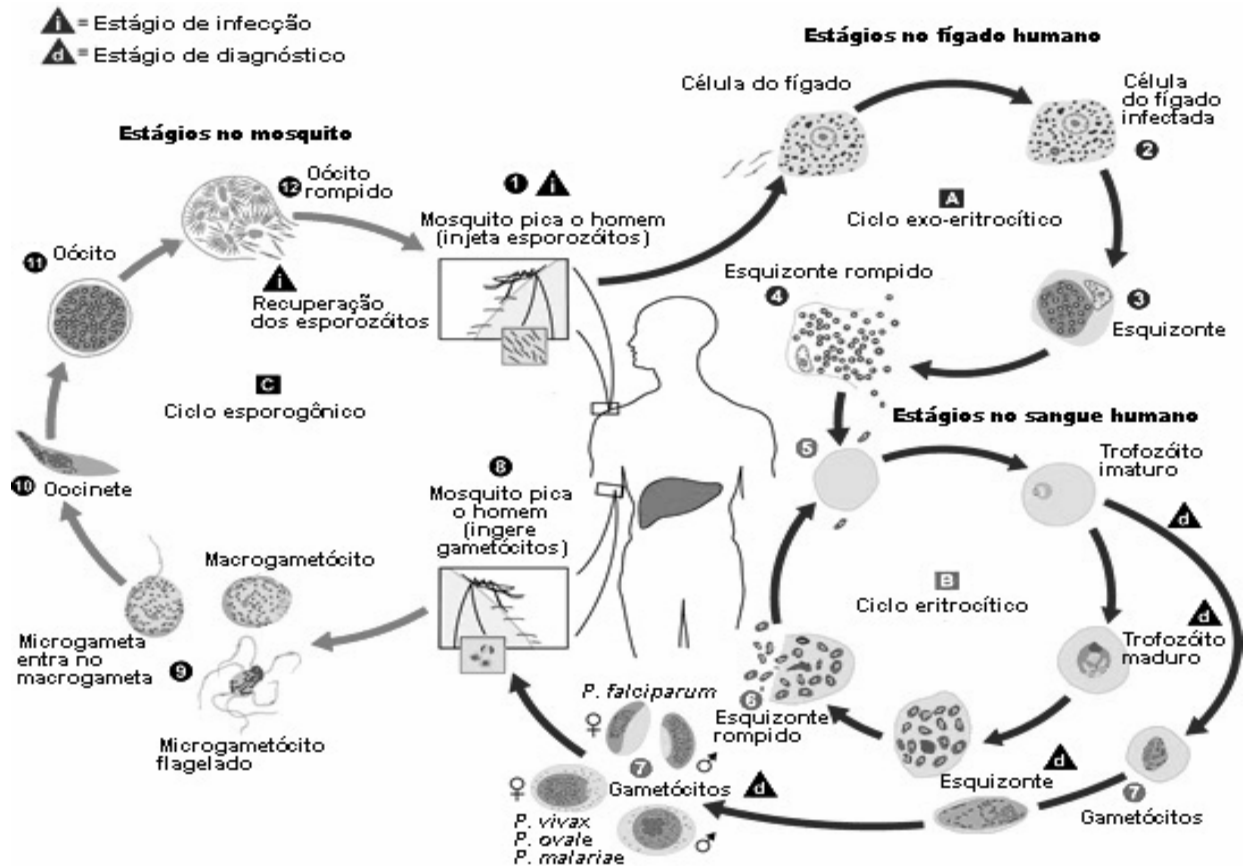


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium*, parasito causador da malária. São conhecidos aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium*, os quais infectam várias espécies de vertebrados. 4 deles infectam seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Fonte: ref. 7.

A PQ também é efetiva contra os gametócitos do *P. falciparum* [8]. Mais recentemente, a PQ tem sido usada, em combinação com a clindamicina, contra a pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP), doença associada à Aids [9].

Na década de 1950, observou-se, em camundongos, que a PQ possuía também atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Normalmente, os fármacos de escolha contra a doença são benznidazol ou nifurtimox [7]. Porém, o grupo de pesquisa da FCF/USP conseguiu resultados satisfatórios contra formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas-like do *T. cruzi*, empregando PQ em formulações de pró-fármacos. O emprego de pró-fármacos objetiva a diminuição de toxicidade observada para o composto puro, ou a utilização de dois fármacos com mecanismos de ação diferentes em só molécula. Além de conseguir-se liberação da substância ativa na região de sua ação, ocorrendo maior especifici-

dade de liberação do pró-fármaco utilizado, na organela considerada. Assim, PQ e qualquer outro medicamento empregado contra a doença de Chagas, poderão penetrar mais rapidamente na célula do parasito, exercendo o efeito tripanomicida [1].

A doença de Chagas, assim como a malária, tem ocorrência predominante em regiões de maior pobreza. Ocorre do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina, com maior incidência em regiões pobres e/ou rurais das Américas Central e do Sul. Atualmente, os movimentos migratórios acarretaram um aumento de contaminação nos EUA, por transfusão de sangue. A doença de Chagas crônica é um grande problema de saúde pública em muitos países da América Latina. A Figura 4 apresenta o ciclo de vida do *Tripanossoma*.

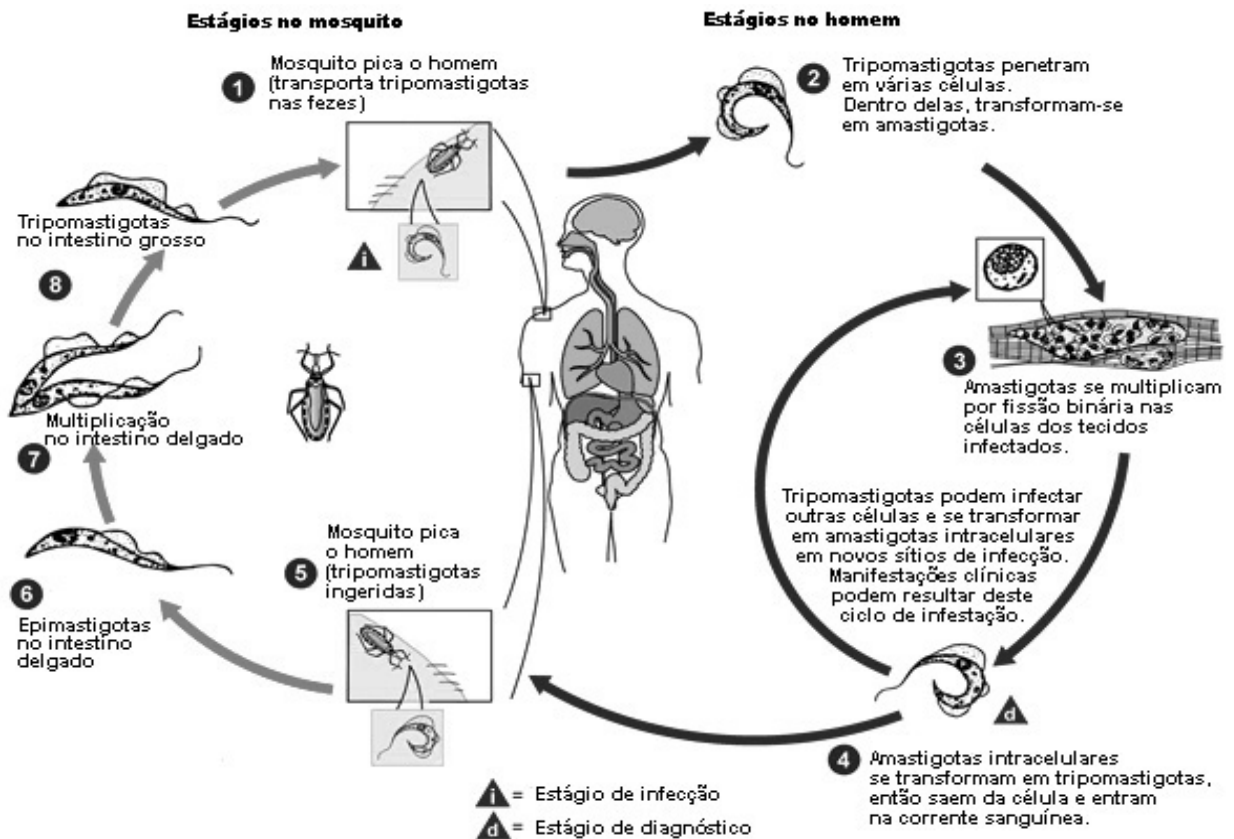


Figura 4: Ciclo de vida do *Tripanossoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas. Fonte: **ref. 7**.

Um inseto infectado (“barbeiro”) pica um hospedeiro e libera formas tripomastigotas nas fezes, perto do local da picada. As tripomastigotas entram no hospedeiro pelo ferimento ou através de membranas mucosas, como a conjuntiva (**1**). Dentro do hospedeiro, as tripomastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam por fissão binária nas células dos tecidos infectados. Amastigotas intracelulares se transformam em tripomastigotas, então saem da célula e entram na corrente sanguínea.

mastigotas invadem as células, onde elas se transformam em amastigotas intracelulares (2). As amastigotas se multiplicam por fissão binária (3) e se transformam em tripomastigotas, sendo liberadas então na corrente sanguínea (4). As tripomastigotas infectam as células de uma variedade de tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos sítios de infecção. As manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. As tripomastigotas da corrente sanguínea não se replicam, diferentemente da tripanossomíase africana. A replicação ocorre somente quando os parasitos entram numa nova célula ou são ingeridos por outro vetor. O “barbeiro” torna-se infectado por sugar o sangue que contém parasitos (5). As tripomastigotas ingeridas transformam-se em epimastigotas no intestino do vetor (6). Os parasitos se multiplicam no intestino delgado (7) e se transformam nas tripomastigotas metacíclicas infectivas no intestino grosso (8). O *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusões de sangue, transplante de órgãos, através da placenta ou em acidentes de laboratório [7].

1.2. Metabolismo e mecanismo de ação da primaquina

Apesar de ser um composto com alta toxicidade, podendo causar anemia hemolítica, principalmente em pacientes com deficiência da enzima glicose 6-fosfatodesidrogenase (G6PD), ou metemoglobinemia, a PQ é o fármaco de escolha para o tratamento radical de *P. vivax* e *P. ovale*. Pode também ser empregada em tratamento conjunto com cloroquina (CQ), por causar efeito sinérgico sobre a atividade da CQ [10].

O mecanismo de ação exato da PQ ainda não foi estabelecido, podendo-se considerar a ação da PQ por si mesma, ou mais provavelmente a ação de espécies reativas intermediárias sobre o parasito, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres, espécies estas que seriam formadas durante o processo metabólico da PQ [6,8,11-13]. Fármacos como cloroquina ou quinino atacam os estágios sanguíneos do parasito. No entanto, somente a PQ

pode erradicar o parasito do fígado. A PQ mata os parasitos nos estágios latente e de desenvolvimento assexuado no fígado, e esteriliza os estágios sexuados no sangue. Portanto, a PQ tem ação esquizotocida, gametocida e hipnozoitocida [11]. Estudos recentes de proteômica não conseguiram identificar uma única proteína de *P. falciparum* que fosse alvo para CQ ou PQ, embora estes fármacos sejam inibidores das enzimas humanas aldeído desidrogenase e quinona redutase [10,14].

O metabolismo da PQ é complexo e não foi ainda compreendido de forma definitiva. Sua biotransformação, envolve um processo de óxido-redução da molécula original de PQ, para formação dos respectivos metabólitos, os quais provavelmente possuirão atividade oxidativa sobre os parasitos. Esta etapa inicial de biotransformação da PQ em seu(s) metabólito(s) é primordial, e as reações para produção dos metabólitos são pouco estudadas e não há uma proposição que explique como os metabólitos são formados. Dentre os metabólitos conhecidos ou sugeridos, não há um exclusivamente que tenha sido relacionado diretamente à ação da PQ contra qualquer parasito [4,6]. Quanto à forma de ação, sabe-se que alguns metabólitos, sendo espécies hidroxiladas ou radicalares e altamente reativas, aparentemente rompem as membranas mitocondriais do parasito, causando impossibilidade de respiração celular [4].

Nos mamíferos, menos de 1% da PQ é eliminada nesta forma, na urina. O principal metabólito encontrado no plasma sanguíneo é a carboxiprimaquina (CPQ). A CPQ resulta da α -oxidação do grupo amino primário e é uma transformação extremamente rápida após administração intravenosa de PQ. A CPQ foi primeiramente descoberta como um metabólito microbial da PQ, depois em ratos, macacos e no homem [15]. Alguns dos problemas enfrentados na determinação exata do metabolismo da PQ são a dificuldade de se isolar os seus metabólitos a partir de amostras biológicas, por extração com solventes, e a instabilidade dos mesmos, os quais são suscetíveis à decomposição oxidativa. A identificação de metabólitos isolados é dificultada também porque muitos dos compostos têm características cromatográficas, ou espectrométricas, muito parecidas [16].

Outros metabólitos encontrados em fluídos biológicos de animais foram a 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ), 5-hidroxidesmetilprimaquina (5-H-6-DPQ), 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina (DHAQ) [12,13], e 6-metoxi-8-aminoquinolina (MAQ) [13]. As estruturas destes metabólitos mais conhecidos são apresentadas na Figura 5. Apesar de todos estes metabólitos terem sido identificados *in vivo*, suas propriedades oxidativas foram estudadas apenas *in vitro*, e considerando somente sua ação tóxica sobre os eritrócitos humanos, mas não sua atuação efetiva sobre o parasito em seus diferentes estágios de desenvolvimento [4-6,10-16]. Dentre os metabólitos citados, não se considera a CPQ um composto ativo contra o parasito, de forma direta. Por outro lado, a 5-HPQ é considerada como um agente fundamental na atividade antiparasitária da PQ, provavelmente através da formação de espécies intermediárias reativas, a partir de reações no ciclo oxidativo da PQ.

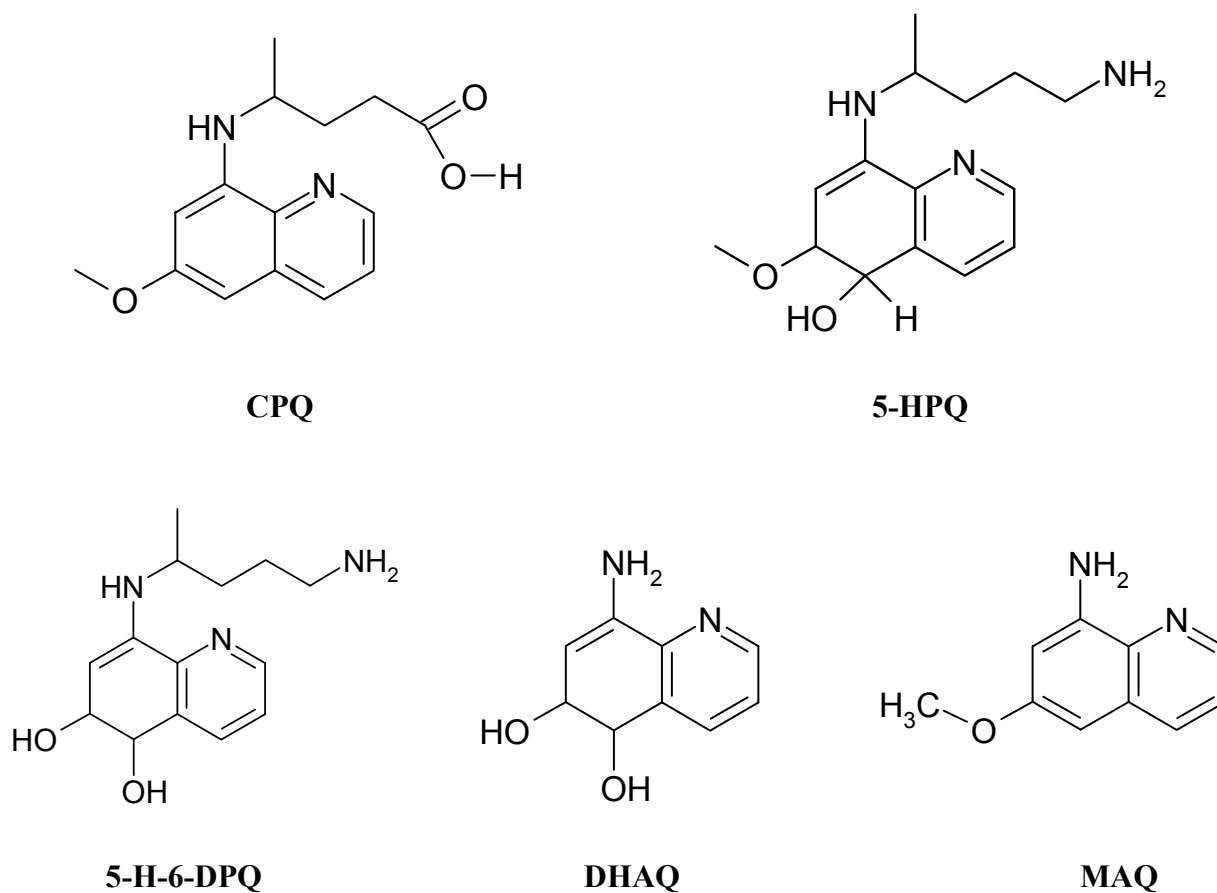


Figura 5: Estruturas das moléculas dos metabólitos mais conhecidos da primaquina.

Desde o início dos estudos com derivados 8-aminoquinolínicos contra a malária, como a pamaquina ou a PQ, alguns trabalhos propuseram que os metabólitos destes compostos seriam os responsáveis por efeitos tóxicos, e outros supunham que os metabólitos também seriam os agentes ativos contra o parasito [17]. Atualmente, apesar de se saber indubitavelmente que a PQ causa estresse oxidativo nas células, não há confirmação se os efeitos farmacológicos observados após sua administração são devidos a ela mesma, ou especificamente a algum de seus metabólitos. Nem o mecanismo terapêutico da PQ, nem sua ação tóxica, são conhecidos em detalhes, há apenas hipóteses e suposições [8]. Em geral os trabalhos nesta área, até o presente momento, estão mais focados no entendimento do metabolismo da PQ exclusivamente, sem a finalidade específica de avaliar quais os efeitos dos metabólitos, ou da PQ em si, sobre o parasito.

Strother *et al.* [17] realizaram experimentos para identificar os possíveis metabólitos da PQ, eliminados na urina de cães, ou produzidos *in vitro* por fígado de ratos. Os autores fizeram uma breve revisão e, de acordo com seus próprios resultados, consideraram que o metabólito 5-HPQ é o agente tóxico mais provável, derivado da PQ. Citando outros autores, mostraram rotas metabólicas possíveis para a pamaquina, ou PQ, envolvendo a hidroxilação na posição 5 da molécula, como sendo a rota mais provável. Outra proposta seria a *O*-desalquilação na posição 6 das moléculas. Os autores consideraram, para efeito do estudo, 8 metabólitos modelo, mostrados na Figura 6. No decorrer do trabalho, os metabólitos presentes em todos seus experimentos, cromatográficos e espectrométricos (espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear), foram os que apresentaram um grupo hidroxila na posição 5 e a cadeia lateral amínica na posição 8. Os metabólitos foram usados para avaliar sua capacidade de produzir metemoglobina (MetHb), sendo os mais potentes aqueles que possuíam justamente o grupo OH na posição 5 da molécula, enquanto que a cadeia lateral pareceu não ter influência. No entanto, as conclusões do estudo não esclarecem a ação da PQ sobre o parasito.

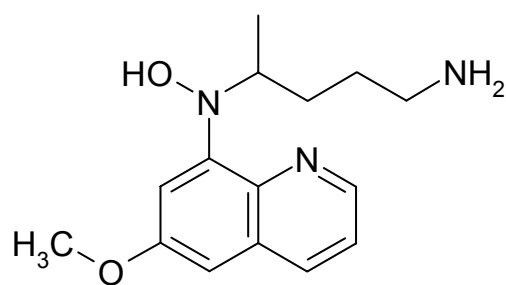
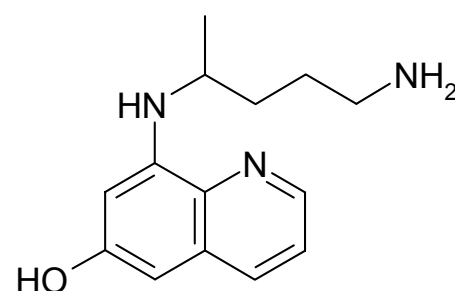
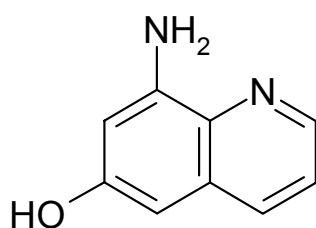
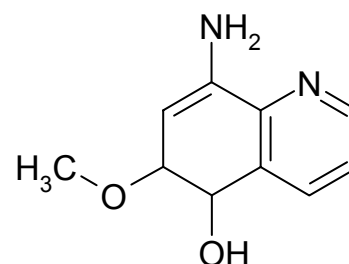
**N-hidroxiprimaquina****6-hidroxiprimaquina****6-hidroxi-aminoquinolina****5-hidroxi-6-metoxi-aminoquinolina**

Figura 6: Estrutura das moléculas dos metabólitos considerados por Strother *et al.* [17], além dos 4 apresentados na Figura 5, exceto a CPQ.

Clark *et al.* [18] usaram um grande número de microrganismos, fungos e streptomices, como modelos para o metabolismo da PQ em mamíferos, numa tentativa de isolar e identificar seus metabólitos. Cerca de 1/3 dos microrganismos foram capazes de metabolizar a PQ a um ou mais metabólitos. A estrutura dos metabólitos foi determinada por estudos de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Chegaram à determinação da 8-(4-acetamido-1-metilbutilamino)-6-metoxiquinolona, resultante da acetilação da PQ, e da 8-(3-carboxil-1-metilpropilamino)-6-metoxiquinolona, resultante da desaminação oxidativa da PQ, como os prováveis metabólitos. Os autores não propuseram uma explicação para a desaminação da PQ, supondo que poderia acontecer via uma desaminação hidrolítica seguida de uma oxidação. Estes resultados são bastante diferentes do que encontraram Strother *et al.*, já que os autores não utilizaram amostras reais, mas sim um modelo em microrganismos. Como foram realizados na mesma época, supõe-se que estes autores não tivessem conhecimento dos experimentos de Strother.

McChesney e Sarangan [19] avaliaram a característica da PQ, de apresentar uma rápida troca de hidrogênio da posição 5 da molécula. Em experimentos para deutear a molécula de PQ, observaram que a posição 5 tem mais facilidade em sofrer troca de hidrogênio, seguida pela posição 7 (ao passo que as posições 2, 3 e 4, que também possuem hidrogênios, não apresentam tal capacidade). Na tentativa de explicar tal comportamento, consideraram que a dificuldade da posição 7 em sofrer a troca de maneira tão rápida deve-se a maiores efeitos estéricos em relação à posição 5, além de uma ativação *para* (5) ser mais facilitada em relação à ativação *orto* (7), em substituições aromáticas eletrofilicas. Os autores consideraram de grande importância a reatividade da posição 5 da molécula de PQ, com relação à atividade biológica do fármaco. A rápida troca observada enfatiza a alta reatividade da PQ como eletrófilo. É provável que vários eletrófilos biológicos (tais como prótons, carbocátions, grupos carbonila, aminas catiônicas) possam sofrer substituição no C-5 *in vivo*. Assim, os autores consideraram que esta hipótese pode proporcionar um mecanismo para inativação de enzimas específicas, ou ácidos nucleicos, ou ainda a fixação em membranas e sua consequente modificação. Todas estas hipóteses, ou qualquer delas, poderiam explicar o mecanismo pelo qual a PQ manifestaria sua atividade biológica.

Augusto *et al.* [20] observaram que a interação da PQ com as células vermelhas do sangue causa formação acelerada de MetHb, H₂O₂ e superóxido, bem como a precipitação de corpos de Heinz (molécula de hemoglobina danificada, em geral por oxidação, presente nas células vermelhas do sangue) e hemólise. Observaram em seus estudos que, sob condições aeróbicas, ocorre um ciclo redox da PQ, envolvendo formação de radicais de oxigênio, os quais têm papel fundamental nos efeitos tóxicos e terapêuticos da PQ. Em um trabalho subsequente, Augusto *et al.* [21] relataram que na presença de PQ e extratos de *T. cruzi*, ocorre aumento na produção de radicais OH. Seus resultados são comparáveis àqueles obtidos com o tripanomicida mais conhecido, o nifurtimox. De forma geral, os autores incluem a PQ na classe de fármacos antipro-

tozoários que agem através de um ciclo redox, com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO).

Augusto *et al.* [22] discutiram a hipótese de que a PQ poderia agir primeiro sofrendo oxidação a um fenol, para em seguida originar uma quinona-imina, ressaltando que não havia evidência da geração de radicais livres durante o metabolismo oxidativo da PQ e que as quinona-iminas não necessariamente reagem com o oxigênio, para formar radicais oxigenados. Relataram que a oxidação da PQ, catalisada por peroxidase e H_2O_2 , ou MetHb e H_2O_2 , envolveu mais de um grupo reativo na molécula e resultou na geração de espécies radicalares livres. Perceberam maior facilidade de oxidação em meio ácido, e relataram que além da estabilidade do radical não ser afetada pelo oxigênio, diminuía com o aumento do valor do pH. Considerando a *O*-desalquilação, detectaram pequena concentração de metanol (produção não quantitativa), como produto da formação de quinona-imina, o que levou os autores à conclusão de que a ausência de *O*-desalquilação seria a rota principal de oxidação da PQ. Seus cálculos a partir de simulações de espectro sugeriram a formação de um cátion radical. Concluíram finalmente que os produtos de oxidação da PQ poderiam sofrer reações de condensação e, mais importante, poderiam reagir com várias biomoléculas.

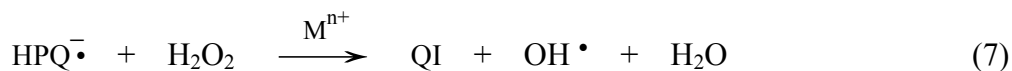
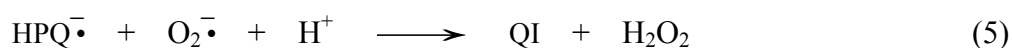
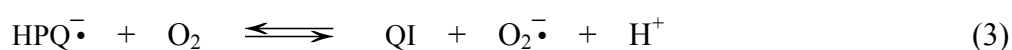
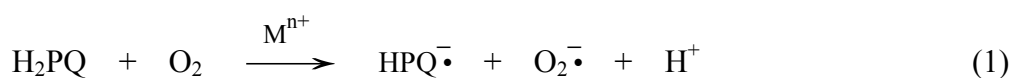
Fletcher *et al.* [12] conseguiram detectar os metabólitos da PQ, 5-HPQ e 6-desmetilprimaquina, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, em estudos com ratos e macacos. Aprofundando seus estudos, analisaram a interação destes metabólitos com eritrócitos normais e deficientes na enzima G6PD, e com preparações de hemoglobina, numa tentativa de elucidar os mecanismos de ocorrência da metemoglobinemia e anemia hemolítica, associadas com o uso da PQ. Os autores propuseram um mecanismo para os efeitos dos metabólitos da PQ no eritrócito, a partir da 5-HPQ, com participação enzimática e de espécies de oxigênio, com formação de um radical semiquinonaimínico. Consideraram relevante a probabilidade da produção de espécies ativas de oxigênio e radicais livres, a partir das reações de metabólitos hidroxilados na posição 5, já que diferentes pesquisas interligam espé-

cies radicalares de oxigênio com a morte do parasito da malária. A hipótese dos autores é de que os efeitos oxidantes da PQ podem ser devidos à geração de radicais livres, superóxido e peróxido de hidrogênio.

O objetivo de Baker *et al.* [15] foi descobrir variações estruturais que pudessem ser feitas na PQ, a fim de minimizar a velocidade de inativação metabólica da molécula original, sem perda da atividade antimicrobiana. Uma das alterações estruturais foi a introdução de 2 átomos de deutério no carbono adjacente ao grupo amínico primário. A outra alteração consistiu em mover o grupo metil da posição 4 da cadeia lateral, adjacente ao nitrogênio da anilina, para a posição 1 da mesma cadeia, adjacente à amina primária alifática (quinocida). Observaram que a taxa de metabolismo da PQ deuterada foi muito menor que a da PQ pura. A transformação metabólica da PQ na posição 4', produziu 59 vezes menos 6-metoxi-8-aminoquinolina, do que o observado para a conversão da PQ a CPQ. Portanto, fica evidente que a oxidação adjacente ao nitrogênio alifático é bem mais eficiente que a adjacente ao nitrogênio da anilina. Os autores perceberam que a atividade esquizotocida da PQ, PQ deuterada ou quinocida foi essencialmente a mesma, mas consideraram que estudos *in vivo* poderiam revelar que a PQ deuterada teria ação mais eficaz, pela dificuldade de remoção do grupo amino primário, essencial para a ligação do fármaco ao parasito no fígado. No entanto, tais resultados podem sugerir, por outro lado, que a formação da CPQ não é passo fundamental no processo de ação da PQ contra o parasito, como observado nos experimentos de Strother.

Vásquez-Vivar e Augusto [13,23] estudaram a oxidação e o ciclo redox de metabólitos hidroxilados de PQ (5-HPQ, 5-H-6-DPQ, e DHAQ), bem como sua atividade oxidativa, assim como de outros metabólitos, em eritrócitos de ratos, *in vitro* e *in vivo*. Portanto, as autoras não consideraram a etapa de formação dos metabólitos a partir da PQ. Demonstraram a formação de peróxido de hidrogênio, produtos quinonaimínicos, radicais intermediários do fármaco e radicais hidroxilados. Sugeriram que o H₂O₂ seja o produto tóxico em potencial, formado a partir dos metabólitos hidroxilados. Deve-se notar que todos os metabólitos estudados têm um

grupo hidroxila na posição 5 da molécula de PQ. As autoras discutem que estes metabólitos mostraram interação *in vitro* com a hemoglobina humana pura, hemolisatos caninos e eritrócitos humanos, bem como o fato de serem mais efetivos que a PQ em oxidar a hemoglobina e esgotar a glutatona reduzida dos eritrócitos, suportando a hipótese que eles podem ser importantes na promoção dos efeitos tóxicos da PQ [12]. Demonstraram ainda que os metabólitos hidroxilados da PQ se oxidam facilmente em condições fisiológicas, formando peróxido e os respectivos derivados quinonaimínicos. Tanto a oxidação como o ciclo redox dos metabólitos foram acompanhados pela formação de radicais hidroxilados, mas somente aquele derivado da 5-HPQ pode ser detectado no caso do ciclo redox. Propuseram um mecanismo esquemático de oxidação para os metabólitos da PQ, envolvendo reações com oxigênio, peróxido e ânion superóxido, baseado em estudos de oxidação de várias hidroquinonas, o qual é mostrado no Esquema 1.



Esquema 1: Reações propostas para oxidação da primaquina. H_2PQ , HPQ^- e QI são o metabólito hidroxilado, a semiquinonaimina e a quinona-imina, respectivamente. Ref. 23.

As autoras propuseram que o ânion superóxido, uma vez formado na etapa inicial, poderia reagir rapidamente com os compostos tipo *o*-difênol reduzidos (reações 1 e 2), no entanto

não conseguiram demonstrar esta reação e portanto a geração deste radical. Consideraram que a diferença principal entre a 5-HPQ e os outros metabólitos hidroxilados estudados (5-H-6-DPQ e DHAQ) reside na posição do equilíbrio de comproporcionamento (reação 4 – reação radicalar), o qual é deslocado no sentido de formação de semiquinonaimina ($\text{HPQ}^{\cdot-}$), no caso da 5-HPQ. Por outro lado, a ação inibitória da superóxido dismutase sobre a fase lenta dos últimos processos do Esquema 1 pode ser atribuída a uma remoção indireta da semiquinonaimina derivada de 5-HPQ, através da reação 3. Concluíram, de todos os resultados, que o peróxido de hidrogênio é o produto tóxico em potencial, formado através do ciclo redox e oxidação dos metabólitos hidroxilados da PQ. O próximo passo foi tentar entender a hemotoxicidade da PQ, examinando *in vitro* e *in vivo* a atividade oxidativa dos metabólitos conhecidos. As autoras compararam as atividades da PQ e de seus metabólitos 5-HPQ, 5-H-6-DPQ e MAQ em eritrócitos de ratos. Seus resultados sugeriram que os derivados quinonaimínicos de 5-HPQ e 5-H-6-DPQ são os metabólitos mais efetivos na expressão da hemotoxicidade da PQ, oxidando a hemoglobina e esgotando o sulfidril não proteico (glutathiona, cisteína) dos eritrócitos, enquanto o MAQ parece não ter relevância. Consideraram que seus resultados não suportavam a proposição de que haveria um mesmo mecanismo hemotóxico para a PQ e a anilina. Reações metabólicas de *N*-hidroxilação da anilina, produzindo fenilhidroxilamina, são mais eficientes em produzir metemoglobinemia do que reações de hidroxilação do anel quinolínico, para formar aminofenóis. Ao contrário, os metabólitos da PQ hidroxilados no anel, foram mais efetivos *in vivo* que MAQ, o precursor do derivado hidroxilamínico da PQ. As autoras somente desconsideraram a hipótese de ocorrer a hidrólise amínica da cadeia lateral da PQ, numa série de reações que levariam do mesmo modo a um derivado hidroxilamínico da PQ, o qual teria tanta ação sobre a hemoglobina quanto a anilina.

Idowu *et al.* [16] examinaram o metabolismo da PQ *in vitro*. Por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, encontraram como principais metabólitos da PQ, extraídos de microsomas de fígado de ratos através de derivatização, a 5-HPQ, 5-H-6DPQ, 3'-HPQ e 3'-hidroxi-6-DPQ. Observaram, por estudos de incubação com os microsomas, que

quinonaiminas não são metabólitos verdadeiros, e sim são formados durante o isolamento dos metabólitos aminofenólicos. Propuseram que a PQ produz inicialmente 5-HPQ ou 3'-HPQ como metabólitos principais, os quais subseqüentemente formam outros compostos. Em seu trabalho, não detectaram a CPQ, somente lactamas, das quais a CPQ pode ser um precursor. Por outro lado, identificaram a 5-H-6DPQ como o principal metabólito nos microsossomos de ratos e mostraram que, em sua produção, a hidroxilação da posição 5 da molécula ocorre antes da desmetilação do grupo metóxi da posição 6. Portanto, o que se pode concluir do trabalho destes autores, sendo um dado importante do estudo do metabolismo da PQ, é que a hidroxilação da posição 5 parece ser o primeiro passo do processo metabólico.

Considera-se que os derivados fenólicos da PQ sejam as principais espécies hemotóxicas. Uma outra hipótese é que a hemotoxicidade esteja associada, em parte ou totalmente, a algum metabólito arilhidroxilamínico, pois a PQ sofre *N*-desalquilação para formar MAQ. Partindo destes dados, Bolchoz *et al.* [24] investigaram a capacidade de microsossomos em produzir o metabólito 6-metoxi-8-hidroxilaminoquinolina (MAQ-NOH), avaliando também se este metabólito estaria envolvido na hemotoxicidade da PQ, causando metemoglobinemia ou danos hemolíticos em eritrócitos de ratos. Obtiveram resultados positivos em ambos os casos, concluindo que esta rota de reação metabólica pode ser expressiva na ação hemotóxica da PQ. Concluíram que a *N*-desalquilação da PQ, formando MAQ, seguida da *N*-oxidação da MAQ, pode ser uma rota metabólica que contribua para a expressão da hemotoxicidade da PQ em humanos.

Bowman *et al.* [25] discutiram a dificuldade em se entender o papel dos metabólitos hidroxilados da PQ, na indução de anemia hemolítica, pois estes não estão disponíveis para estudos, uma vez que os métodos sintéticos de preparação são complexos, e os produtos altamente instáveis. Assim, os autores sintetizaram a 5-HPQ e examinaram sua estabilidade e seu comportamento redox, trabalhando com técnicas como cromatografia líquida, ressonância magnética e espectrometria de massa, voltametria cíclica e incubação eritrocítica. Observaram que a 5-HPQ é um agente hemolítico extremamente potente em ratos e que a atividade hemo-

lítica está associada com a formação de metemoglobina e uma acentuada queda da concentração eritrocítica de glutathione. Consideraram que seus dados poderiam explicar a dramática diferença na sensibilidade à PQ observada entre indivíduos normais e indivíduos deficientes na enzima G6PD. Discutiram a diferença observada na suscetibilidade à PQ e a outro fármaco que também causa efeitos hemolíticos, a dapsona. A PQ causa um efeito hemolítico 10 vezes maior que a dapsona. Concluíram que, enquanto a hemotoxicidade da dapsona é mediada por um único metabólito hidroxilamínico, a PQ pode exibir um efeito sinérgico entre múltiplos metabólicos tóxicos, incluindo *N*-hidroxi, quinonaimina e quinona.

Devido tanto às diversas possibilidades de oxidação e formação de derivados ativos de PQ, quanto à pouca informação especificamente a respeito da etapa inicial desta oxidação, pode-se constatar a importância de qualquer estudo que proponha ou avalie seu mecanismo de oxidação, considerando não apenas sua ação tóxica sobre eritrócitos ou quaisquer organelas animais, mas principalmente sua ação específica contra qualquer estágio de desenvolvimento do parasito.

Deste ponto de vista, esta tese vem somar esforços ao campo de estudo de fármacos de interesse no combate de doenças tropicais, especificamente da PQ, numa tentativa de agregar dados a respeito de seu mecanismo de óxido-redução, pois sua atividade oxidativa é aceita como fundamental no processo de eliminação do parasito, como pode ser notado através dos trabalhos citados.

1.3. Mecanismos de óxido-redução e técnicas voltamétricas

Como se pode verificar através literatura discutida, constatou-se que a PQ sofre processo redox dentro do organismo, formando uma série de metabólitos que serão então ativos contra o parasito, mas também causando efeitos hemolíticos indesejados. Portanto, numa tentativa de esclarecer o mecanismo de tal processo redox, *in vitro*, considerou-se o emprego de métodos eletroquímicos no estudo do comportamento redox da molécula da PQ e eventualmente de seus metabólitos de interesse. As técnicas eletroanalíticas são, atualmente, algumas das mais poderosas ferramentas no estudo do comportamento de compostos orgânicos, de interesse em diversos setores, como biológico, industrial, farmacêutico [26]. Dentre elas, a voltametria é a técnica mais utilizada, tanto em métodos quantitativos como qualitativos, por sua versatilidade, podendo estar acoplada a outras instrumentações.

Em trabalhos de avaliação do comportamento eletroquímico de diferentes classes de compostos, os métodos voltamétricos ou amperométricos têm sido usados freqüentemente como ferramenta para explorar mecanismos de oxidação ou redução eletroquímicas. Propiciam a oportunidade de propor rotas, estudar metabólitos e realizar a detecção dos mais variados compostos, em formulações farmacêuticas ou fluídos biológicos. A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais simples e poderosa no exame de propriedades eletroquímicas de uma substância qualquer. Tanto informações termodinâmicas quanto cinéticas são disponibilizadas em um experimento deste tipo. Pode-se obter dados sobre a reversibilidade de um sistema, sobre processos de adsorção superficial no eletrodo, sobre a velocidade de transferência de elétrons entre substâncias e eletrodos, e também sobre as velocidades e natureza dos processos químicos associados à transferência de elétrons. Portanto, processos eletroquímicos ou químicos sofridos pela PQ, principalmente aqueles que levem ao esclarecimento sobre a formação de metabólitos, podem ser avaliados através do uso do poder de diagnóstico da VC, que pode nos fornecer uma impressão digital da molécula em seu ciclo redox [27-29].

Assim, visando estudos aplicados de proposição de mecanismos e determinação analítica, há trabalhos empregando várias técnicas, dentre elas os métodos voltamétricos. Chevion *et al.* [30] produziram um trabalho muito interessante sob esta ótica, avaliando a capacidade antioxidante humana através de VC. Discutiram profundamente as implicações das condições causadoras de estresse oxidativo e seu controle, partindo do pressuposto que as células humanas, dos animais e das plantas, estão continuamente expostas a uma variedade daquelas condições, que acabam por causar estresse oxidativo. Estas condições podem se originar de fontes endógenas, através de processos fisiológicos normais, como a respiração mitocondrial. Por outro lado, podem resultar de fontes exógenas, como a exposição a poluentes e radiação ionizante. O estresse oxidativo ocorre num sistema biológico depois de um aumento de exposição a agentes oxidantes, uma diminuição na capacidade antioxidante do sistema, ou ambas as situações. Está associado frequentemente com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo os radicais livres, os quais estão fortemente implicados na patofisiologia da doença. As células estão equipadas com vários sistemas de defesa, os quais agem através de vários mecanismos. Eles podem ser classificados como proteção via atividades enzimáticas ou proteção via antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). Os ABPM compreendem muitos compostos, cada um deles agindo como um seqüestrador químico, neutralizando as ERO. ABPM são moléculas pequenas que frequentemente se infiltram nas células, se acumulam (em altas concentrações) em compartimentos específicos associados com danos oxidativos, e então são regeneradas pela célula. Em tecidos humanos, ABPM celulares são obtidos de várias fontes, como: glutathiona, dinucleotídeo nicotinamida-adenina (forma reduzida) e carnosina, são sintetizados pelas células; ácido úrico (AU) e bilirrubina são subprodutos do metabolismo celular; e ácido ascórbico (AA), tocoferóis e polifenóis são antioxidantes obtidos da dieta alimentar. O plasma é frequentemente usado para avaliação de danos causados por radicais livres. Ele contém alvos críticos para os danos oxidativos, como lipoproteínas, e também antioxidantes importantes, como AU e AA e reflete, assim, o estado antioxidante geral, inclu-

indo a “história” recente de estresse oxidativo, a qual resulta dos tecidos e nutrição. Portanto, para avaliar as correlações entre doença, dieta, radicais livres e suplementação vitamínica, os métodos que caracterizem os parâmetros plasmáticos são considerados autenticamente representativos do estado antioxidante de todo organismo. Voltamogramas cíclicos registrados em plasma podem fornecer informações a respeito da exposição *in vivo* do sujeito a estresse oxidativo e acerca da sua condição antioxidante, detectando a presença de AU ou AA. A VC pode ser usada também para monitoramento do sucesso, ou não, do tratamento que o paciente esteja recebendo. Igualmente, a VC permite a determinação da capacidade antioxidante total de plantas comestíveis antes da ingestão, podendo ser usada para monitoramento da qualidade alimentar durante o período de validade do produto. Chevion *et al.* [30] mostraram várias evidências de que o poder redutor total do plasma de pacientes, medido por VC, se correlaciona muito bem com a severidade da doença. Os parâmetros de VC também se correlacionaram com a severidade de um tratamento agudo que o paciente recebeu. Isto se baseia no fato de que o plasma *ex vivo* representa a capacidade antioxidante *in vivo*, antes da coleção do sangue. Os autores inicialmente apontam os parâmetros eletroquímicos analisados no estudo: correntes de pico anódica e catódica (**I_a** e **I_c**) e potenciais de pico anódico e catódico (**E_a** e **E_c**). Na Figura 7, é mostrado o voltamograma cíclico que os autores obtiveram a partir de um plasma saudável. Observam-se 2 picos, 1 e 2, em 500 e 1000 mV. O 1º pico anódico foi atribuído à oxidação de AU e AA, fato confirmado através de várias evidências: reconstituição do pico usando os componentes separadamente, diminuição do pico pela oxidação de AA, diminuição do pico após tratamento com uricase, e seu completo desaparecimento após a remoção dos 2 componentes. Desta maneira, o estudo do plasma humano por VC pode ser feito, considerando os antioxidantes AU e AA, para monitoração do estado dos pacientes em tratamento. Os autores ressaltam que há necessidade de polimento intensivo do eletrodo de carbono vítreo, antes de cada medida, para remoção de resíduos e manutenção da sensibilidade. Este tipo de

tratamento é de fato muito utilizado para eletrodos deste material, por apresentar fortes características adsorptivas.

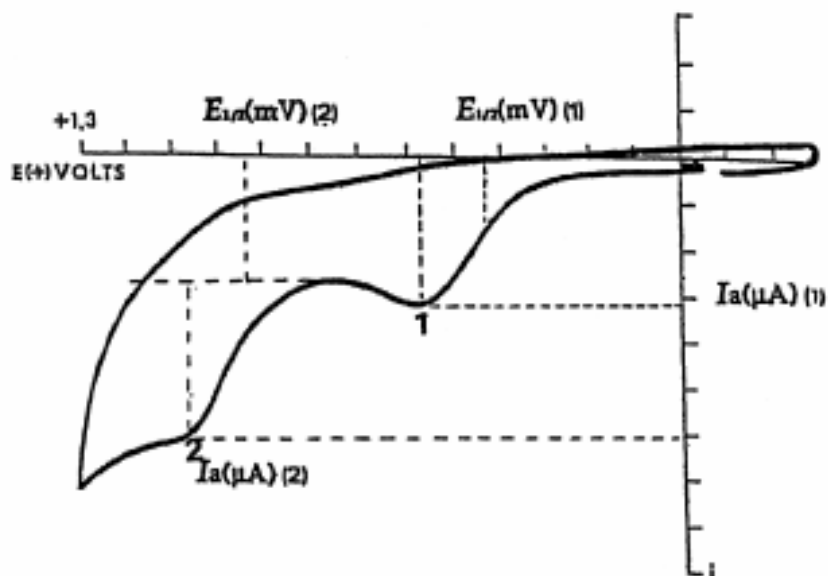


Figura 7: Voltamograma cíclico obtido em plasma humano saudável. Janela de potencial – 0,3 a 1,3 V. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Velocidade de varredura, 100 mV/s. Sob permissão da Elsevier [29].

Portanto, usando esta capacidade de identificação de AA e AU em plasma humano, os autores estudaram 2 grupos de pacientes. O primeiro grupo consistia de pacientes sofrendo de diabetes. O segundo foi submetido a irradiação (da sigla em inglês TBI – “total body irradiation”) antes de transplante de medula óssea. A irradiação é um procedimento comum, no tratamento da leucemia, antes de transplantes, e gera ERO, as quais reagem com componentes celulares, inativando células da medula.

O plasma dos pacientes que sofriam de leucemia, que foram submetidos a TBI, foi analisado para avaliar a condição antioxidante destas pessoas. Paralelamente, os níveis de AA e AU foram determinados também por cromatografia líquida de alta resolução. A Figura 8 apresenta os voltamogramas obtidos.

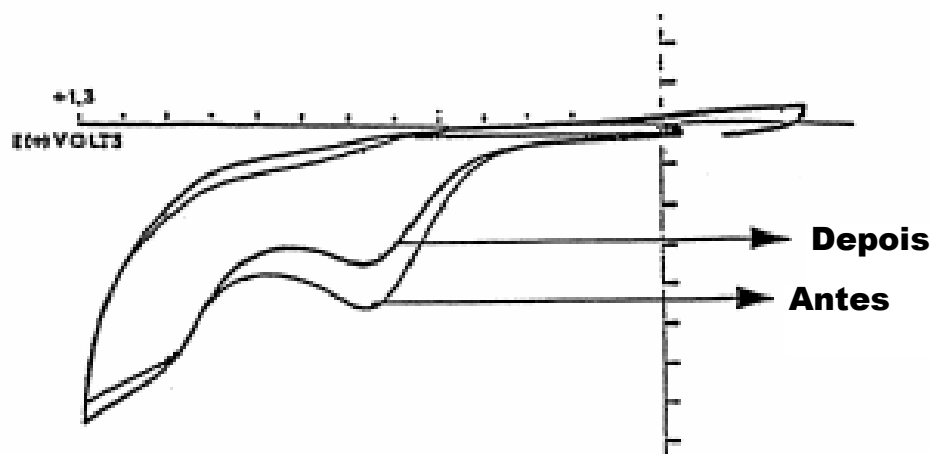


Figura 8: Voltamogramas cíclicos obtidos de pacientes com leucemia, antes e depois de receber tratamento de irradiação, previamente a transplante de medula. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Janela de potencial: -0,3 a 1,3 V. Velocidade de varredura, 100 mV/s. O plasma foi coletado em heparina. Sob permissão da Elsevier [30].

Os autores perceberam que a capacidade antioxidante diminuiu cerca de 36% em comparação a dados normais, como reflexo dos valores de **I_a** obtidos, já que os valores de **E_a** praticamente não mudaram. 4 meses após o tratamento, **I_a** foi recuperada a um nível 22% maior que antes do tratamento. Ambos AA e AU diminuíram de concentração após a irradiação, a uma taxa de 84 e 24% respectivamente, e retornaram a níveis de 21 e 320% após 4 meses. Os autores consideraram que o uso da VC levou a um entendimento mais apurado do balanço entre o estresse oxidativo e a presença de antioxidantes, bem como a uma reconsideração quanto à prescrição de um suporte de antioxidantes antes e/ou depois do tratamento com TBI.

Faria e Santos [31] estudaram o comportamento da PQ em soluções diluídas utilizando técnicas como espectroscopia Raman, ressonância eletrônica paramagnética, voltametria cíclica, espectroeletroquímica e espectroscopia óptica. Observaram que a PQ sofre oxidação facilmente, em pH 7,0, em presença de oxidantes como PbO₂, Ce(IV) ou Cr(VI), o que foi corroborado por experimentos de voltametria cíclica, com obtenção de corrente anódica em aproximadamente 1,0 V. Os autores comprovaram que a oxidação da PQ era um processo irreversível e controlado por difusão, mesmo a altas velocidades de varredura, fato atribuído a uma reação química acoplada à reação eletroquímica. Demonstraram a formação de um cátion

radical, que absorve fortemente na região do visível, e decai com o tempo como função da reação entre as espécies radicalares e a PQ não oxidada, independentemente da concentração de oxigênio no meio. Este é um dado importante para os estudos de ação da PQ, pois *in vivo* há de fato presença de oxigênio, o que não justificaria estudos em meios sem oxigênio, de nitrogênio ou argônio.

Considerando as hipóteses levantadas por McChesney e Sarangan [19], Chyan *et al.* [32] correlacionaram a rápida troca sobre o C-5 da molécula e um sinal acentuado, da reação de redução de H^+ , observado em voltametria cíclica. Os autores salientaram que a natureza dissociativa do próton aromático em C-5 pode contribuir em parte para sua instabilidade eletroquímica. Concluíram que as diferenças de corrente de pico observadas em voltamogramas sucessivos em solução de PQ, são devidas ao bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho, por produtos eletroquímicos da oxidação da PQ, supostamente dímeros. Tornando-se o meio mais rico em H^+ , os autores ainda observaram o mesmo comportamento, apenas de forma mais lenta. Segundo os autores, seria possível que a dissociação do próton em C-5 da PQ, e a formação do radical aniônico, afetasse a absorção do fármaco e acabasse por proporcionar um mecanismo específico de atividade farmacológica da PQ.

Como subsídio para seu trabalho sobre a hemotoxicidade da PQ, Bowman *et al.* [25] também realizaram estudos eletroquímicos com 5-HPQ, para avaliar sua capacidade de sofrer processo redox. Examinaram sua atividade eletroquímica usando voltametria cíclica, para determinar se a oxidação da 5-HPQ à sua forma quinonaimínica seria reversível. Obtiveram o voltamograma cíclico mostrado na Figura 9, onde se pode notar a presença de 2 picos de oxidação na varredura direta (A e B) e 1 pico de redução (C), na varredura inversa. Consideraram a formação de um radical semiquinolínico intermediário em A a partir da hidroquinona correspondente, sua oxidação a uma quinonaimina em B, e posterior redução dos produtos de oxidação novamente a hidroquinona, em C. Concluíram que tais resultados suportariam o

conceito de que a 5-HPQ pode sofrer processo redox como um par completamente reversível, no pH fisiológico. Mas os autores não discutiram a irreversibilidade observada para o pico B.

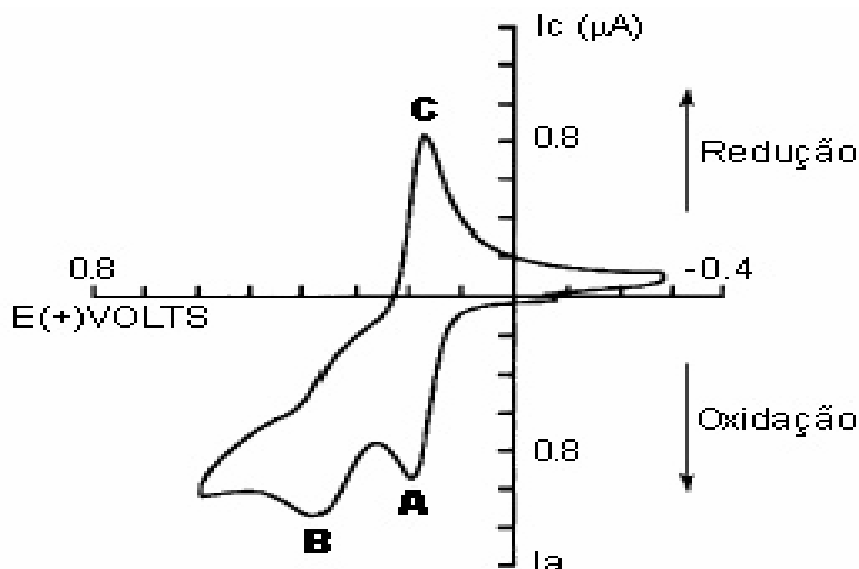


Figura 9: Voltamograma cíclico obtido em solução de 5-HPQ (254 μM) em meio desaerado, pH 7,4, temperatura ambiente. Eletrodo de trabalho: pasta de carbono; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: Pt. Velocidade de varredura, 150 mV/s. Sob permissão da American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (Aspet) [25].

La-Scalea *et al.* [33,34] estudaram a eletro-oxidação da PQ, e realizaram estudos de modelagem molecular a partir da oxidação eletroquímica de PQ e dois de seus pró-fármacos, succinilprimaquina (SPQ) e maleilprimaquina (MPQ), com intenção de obter mais dados sobre o mecanismo redox, visando aplicação da PQ como fármaco antichagásico. Observaram que SPQ e MPQ apresentaram o mesmo comportamento voltamétrico que a PQ, ressaltando que a modificação molecular facilitou a eletrooxidação do fármaco. A oxidação mostrou-se fortemente dependente do pH em meio ácido, indicando que a desprotonação do nitrogênio quinolínico seria um passo determinante, o que levaria a crer que as formas neutras seriam mais eletroativas. Relacionando os resultados que obtiveram com PQ e seus derivados, com os mecanismos de ação propostos até então, e levando-se em conta o comportamento voltamétrico, os autores concluíram que no pH fisiológico, as espécies SPQ e MPQ poderiam ser

mais ativas que a PQ monoprotonada correspondente. O processo de oxidação da PQ envolveria 2 elétrons na etapa determinante da reação eletródica, com formação de uma quinonaimina. Tendo como base o trabalho de Faria e Santos, os autores sugerem a participação de um cátion radical como intermediário, no entanto não estabeleceram as rotas eletroquímicas mais prováveis para a oxidação da PQ.

Nota-se, portanto, que há uma quantidade razoável de informações acerca dos processos metabólicos da PQ, e dos possíveis mecanismos de ação através de um ciclo redox. Este conjunto de dados da literatura levou-nos a considerar que o anel quinolínico desempenharia um papel fundamental no processo de oxidação da PQ. Entretanto, há uma lacuna quanto às rotas prováveis do ciclo redox, ou daquelas plausíveis de acontecerem.

1.4. Eletrodos de trabalho: carbono vítreo e diamante dopado com boro

Uma vasta gama de eletrodos de trabalho podem ser utilizados em voltametria: eletrodos de mercúrio (EGM - gotejante e de gota pendente), filme de mercúrio, ouro, platina, carbono [35-37]. O eletrodo de mercúrio possui características interessantes do ponto de vista da eletroanalítica: a ação do gotejamento é muito reproduzível e a superfície do eletrodo é continuamente renovada. Estes fatores originam medidas de alta precisão e a renovação da superfície tem a vantagem adicional de que o eletrodo não é modificado permanentemente por reações que ocorram na interface eletrodo/solução. O eletrodo de filme de mercúrio (EFM), por possuir volume bem menor que o EGM, apresenta maior sensibilidade, porém considerando-se se há formação de amálgama ou processo de adsorção [38]. Todos os metais nobres apresentam potencial de sobretensão de hidrogênio menor que o mercúrio, e maior dificuldade de serem oxidados. Os eletrodos metálicos sólidos apresentam outras desvantagens em relação

ao EGM, tais como maior corrente residual, menor reprodutibilidade e homogeneidade de superfície. No entanto podem ser utilizados para determinações de espécies com potencial redox positivos. Ouro e platina são usados em medidas voltamétricas, porém não são inertes como o carbono. O carbono possui boa faixa de potencial de trabalho, é razoavelmente inerte quimicamente e relativamente barato. Um caso típico é o eletrodo de carbono vítreo, também usado como substrato para filmes de mercúrio [36]. Os eletrodos de carbono têm ampla aplicação, por possuírem propriedades mecânicas e eletroquímicas que os torna atraentes, ao mesmo tempo em que proporcionam maior entendimento dos fenômenos que tomam lugar da interface eletrodo-solução [39]. Eletrodos de pasta de carbono também são bastante utilizados, devido à facilidade de modificação.

No entanto, principalmente o eletrodo de carbono vítreo, o mais utilizado dentre os eletrodos de carbono, possui corrente de fundo muito alta, o que dificulta a diminuição do limite de detecção no desenvolvimento de metodologia eletroanalítica, além de ser passível a efeitos de adsorção superficial, em especial de espécies orgânicas, causando problemas de bloqueio de resposta e dificuldade de renovação superficial. Assim, vislumbrou-se o diamante como um material alternativo de carbono, com a ressalva de que o diamante puro é isolante, então haveria necessidade de mudar suas características condutoras. Por este motivo, o estabelecimento do método de dopagem de filmes de diamante crescidos em laboratório descortinou uma ampla faixa de possibilidades de aplicação dos mesmos, já então como semicondutores, em diferentes áreas da ciência [40-46]. Uma das aplicações que mais despertou interesse a partir dos anos 1990, foi a fabricação de eletrodos dopados com boro, para uso em aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas. Os eletrodos de diamante dopado possuem várias características importantes, algumas em contraposição às apresentadas pelo carbono vítreo, tais como maior janela de potencial de trabalho, baixa corrente de fundo, estabilidade por longos períodos de trabalho, alta resistência química, biocompatibilidade [42,44]. O diamante dopado tem uma resistividade semelhante ao carbono vítreo, mas um pouco maior que outros materiais de

carbono usados na fabricação de eletrodos, como pode ser visto na *Tabela 1* [47,48], o que no entanto não compromete seu desempenho em experimentos eletroquímicos.

Tabela 1. Propriedades de diferentes materiais de carbono usados na fabricação de eletrodos

Material	Resistividade (Ωcm)	Densidade (gcm^{-3})
Carbono vítreo (Tokai GC-20)	$4,2 \cdot 10^{-2}$	1,5
Fibra de carbono	$(5 - 20) \cdot 10^{-4}$	1,8
Grafite pirolítico altamente orientado (eixo <i>a</i>)	$4,0 \cdot 10^{-5}$	2,26
Grafite aleatoriamente orientada	$1,0 \cdot 10^{-3}$	1,8
Diamante natural	$10^{13} - 10^{16}$	3,52
Diamante CVD terminado em hidrogênio	10^6	3,52
Diamante CVD dopado	$\sim 10^{-2}$	3,52

Tabela adaptada das referências 47 e 48. CVD: *chemical vapor deposition* – sigla em inglês de deposição química a partir da fase vapor.

Diferentes parâmetros devem ser considerados no crescimento de filmes de diamante, para posterior desenvolvimento de eletrodos, os quais envolvem a escolha da mistura gasosa, substrato, método de crescimento, estabelecimento do contato elétrico e montagem final do eletrodo. Para o crescimento de filmes de diamante dopado ou não com boro, vários substratos podem ser utilizados, mas deve-se levar em conta a semelhança entre o parâmetro de rede e / ou o coeficiente de dilatação térmica dos dois materiais, para facilitar o crescimento de um filme aderente e de qualidade. O substrato também deve ser resistente à temperatura de operação do reator. É importante também considerar o tipo de aplicação futura dos filmes ou a disponibilidade de materiais. Diferentes formatos e tamanhos de substrato são empregados e dentre os mais comuns e de menor tamanho estão os materiais planos [43,49-52], fios [53,54], tecidos [55,56], ou mesmo substratos esféricos [57,58]. Podem também ser usados substratos com área grande, em geral no formato plano [59].

Quanto ao dopante, diferentes compostos podem ser usados e injetados no reator simultaneamente com hidrogênio e metano (exceto no caso do emprego de disco sólido, o qual é posicionado dentro do reator, em geral abaixo do substrato, antes de se iniciar o processo). Os dopantes mais empregados são o boro e seus derivados, cada qual com características próprias, tais como: B_2H_6 , que não contém carbono ou oxigênio na molécula, o que evita a inclusão de elementos extras no reator, é facilmente encontrado e possibilita controle de concentração de boro, mas é altamente tóxico, explosivo e reativo [41,60]; B_2O_3 , o mais comum deles, que tem grande disponibilidade, mas também deve ser solubilizado em acetona ou metanol [57,61,62], ou pode ser usado como disco sólido [63]. Outros elementos usados como dopante, são: enxofre [64], nitrogênio [65], fósforo [66], lítio [56,67], podendo-se alterar então o tipo de semicondutor obtido.

Em seguida ao crescimento dos filmes, deve-se proceder à sua caracterização, morfológica e estrutural. Somente com estes dados, pode-se fazer uma avaliação consistente das informações obtidas através de experimentos eletroquímicos. Muitas técnicas podem ser usadas para a caracterização dos filmes de diamante dopado, individualmente ou em conjunto com outras. Cada técnica contempla um tipo específico de análise [68] e as mais comuns são: *Microscopia Eletrônica de Varredura* (do inglês “scanning electron microscopy”, sigla SEM), utilizada para investigar topografia e morfologia superficiais; *Microscopia Eletrônica de Transmissão* (do inglês “transmission electron microscopy”, sigla TEM), possui maior resolução que a técnica SEM e é usada para análises de morfologia e estrutura dos filmes, detectando defeitos da rede; *Microscopia de Força Atômica* (do inglês “atomic force microscopy”, sigla AFM), usada para avaliar morfologia superficial; *Microscopia de Varredura por Tunelamento* (do inglês “scanning tunneling microscopy”, sigla STM), produz imagens de alta resolução da morfologia superficial dos filmes, em escala atômica, sendo também usada para estudar propriedades eletrônicas locais; *Espectroscopia Raman*, investiga a microestrutura dos filmes, identificando a presença de ligações sp^2 em seu interior, fornecendo dados para estudo

de estresse intrínseco, causado pela incorporação do agente dopante na rede cristalina do diamante; *Difração de Raios-X* (do inglês “X-ray diffraction”, sigla XRD), usada para investigar a orientação cristalina, composição e estrutura dos filmes; *Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X* (do inglês “X-ray photoelectron spectroscopy”, sigla XPS), permite a determinação da composição e estrutura dos filmes na região próxima à superfície; *Análise de Detecção da Retração Elástica* (do inglês “elastic recoil detection analysis”, sigla ERDA), permite a medida da incorporação de átomos de agente dopante (baixo número atômico, como boro) nos filmes, e tem maior eficiência que o método dos gráficos Mott-Schottky, porque detecta boro total e não apenas os transportadores de carga.

Tendo feito toda a caracterização dos filmes de diamante dopado, procede-se então à montagem dos eletrodos, de acordo com as necessidades de utilização. Portanto, determina-se o tamanho da área a ser exposta, o formato do eletrodo, tamanho do eletrodo, etc. Um dos parâmetros mais importantes na montagem de eletrodos é o estabelecimento do contato elétrico, normalmente ôhmico (contato entre um metal e um semicondutor), o qual deve apresentar resistência mínima [69]. Igualmente importante é o isolamento de todas as partes do eletrodo que não devem entrar em contato com a solução de medida. O filme deve ter sua borda totalmente vedada, em geral com borracha de silicone, ou deve ser embutido em um material inerte adequado, para que somente a superfície do diamante dopado fique exposta à solução, de modo que não haja infiltração por eventuais orifícios, alcançando-se assim o material usado como suporte [57,62]. Uma das dificuldades enfrentadas nesta etapa é conseguir um isolamento perfeito do filme pelo maior período possível, pois muitas vezes a solução utilizada pode promover o descolamento do material usado para a vedação.

Deve-se ressaltar que os dados sobre os parâmetros de crescimento e de caracterização dos filmes (morfológica e estrutural) são extremamente importantes para quem utiliza eletrodos de diamante, pois os resultados experimentais dependem diretamente das características dos filmes usados na construção dos eletrodos, apesar da maioria dos trabalhos nesta área

simplesmente ignorar esta informação. Uma vez que estes dados e em geral também os dados de caracterização, são mantidos como segredos industriais pelas empresas que atualmente comercializam eletrodos de diamante, a utilização de eletrodos comerciais acaba por impedir o estabelecimento de correlação entre os resultados experimentais obtidos e os parâmetros de cada filme empregado. Desta forma, a existência de uma parceria com o grupo de crescimento de diamante do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/INPE, em São José dos Campos, tem proporcionado avanços importantes no entendimento dos resultados obtidos no laboratório de eletroquímica e eletroanalítica, bem como facilita o estabelecimento dos parâmetros de crescimento mais ajustados para determinado objetivo de utilização.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho apresentado nesta tese, tendo como base os resultados obtidos em laboratório, levando-se em conta o que já se conhece acerca dos metabólitos da primaquina (PQ), e também os dados da literatura, foi propor as prováveis rotas envolvidas no mecanismo de óxi-do-redução da PQ. Assim, pode-se traçar um paralelo de estudo para outros fármacos de mesma classe química, que sofram processos de óxi-do-redução durante sua biotransformação, facilitando a obtenção de informações e a proposição de mecanismos de ação e de métodos de detecção.

Para atingir os objetivos propostos, diferentes tipos de técnicas eletroquímicas (volta-metria cíclica, voltametria de pulso diferencial, cronoamperometria), materiais eletródicos (eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de diamante dopado com boro) e diferentes meios (próti-co e aprótico), foram utilizados para simular, *in vitro*, as reações redox que poderiam ocorrer com a PQ *in vivo*. Concomitantemente, tentou-se determinar o número de elétrons envolvidos no processo. Os resultados forneceram informações importantes e foi possível a proposição de um mecanismo que explicasse o processo de oxidação eletroquímica da PQ.

Iniciou-se o estudo eletroquímico, tendo-se em mente que pode haver formação da 5-HPQ como produto de oxidação da PQ, assim como ocorre *in vivo*. Portanto, deveria ocorrer a inserção de um grupo OH na molécula de PQ, na posição 5 da estrutura, formando a 5-HPQ. Os dados voltamétricos obtidos usando eletrodo de carbono vítreo (ECV), em solução aquosa, de fato confirmaram a hidroxilação da molécula de PQ, após a observação de um fenômeno conhecido, a oxidação anódica do composto aromático, que é a perda de 1 elétron pela molécula para formação de um cátion radical. Este tipo de processo oxidativo acontece facilmente em moléculas que con-têm oxigênio como heteroátomo em sua estrutura, que é o caso da PQ. Detectou-se também a formação de um par redox, o qual apresentou características adsorptivas e posições de potencial de pico típicas do par quinona/hidroquinona. Uma forte adsorção do par redox foi observada em ele-trodo de carbono vítreo, o que não aconteceu com eletrodo de diamante dopado com boro.

Este processo inicial de oxidação e hidroxilação, é imediatamente seguido por outros, que seriam a oxidação eletroquímica imediata do grupo OH ao respectivo =O, sob o potencial

aplicado. A posição 8 também sofre oxidação, com formação de uma imina, =NR, já que aminas aromáticas são facilmente oxidadas, em potenciais anódicos semelhantes aos observados. A variação nos potenciais de pico com o pH sugeriu o envolvimento de prótons na reação de transferência de carga. Como os experimentos foram realizados em meio aquoso, a imina imediatamente sofre hidrólise, formando o derivado quinoidal no anel quinolínico, produzindo uma diamina primária, o que significa outra reação química posterior ao processo eletroquímico. A diamina formada não interferiu nos resultados voltamétricos, porque aminas alifáticas primárias são mais difíceis de se oxidar do que as secundárias ou terciárias. Foram realizados experimentos em solução de 5-HPQ, os quais corroboraram as conclusões anteriores.

Elucidando a questão do meio aquoso fundamental para a hidrólise citada, trabalhou-se em meio aprótico, na presença de dimetilformamida (DMF). Neste caso, os voltamogramas cíclicos apresentaram 2 picos anódicos convoluídos, na região do pico principal da PQ. Observou-se um pico catódico, ausente em meio aquoso, provavelmente relacionado à redução do cátion radical inicialmente formado, ou à redução de produto quinonaimínico formado num segundo processo de oxidação. Consequentemente, como não há a formação do derivado quinoidal, pela hidrólise da imina, o par redox quinoidal/hidroquinoidal derivado da PQ não possui as mesmas intensidades de corrente observadas anteriormente.

Quanto à possibilidade de ocorrência de dimerização da molécula de PQ ou de seus produtos de oxidação, reação comum para este tipo de molécula orgânica, observou-se uma certa multiplicidade de picos em sucessivos voltamogramas, característica deste tipo de comportamento. Mas estas curvas múltiplas, em alguns experimentos, podem estar simplesmente relacionadas com os diferentes processos eletroquímicos citados anteriormente, e não unicamente com uma possível dimerização. Por outro lado, considerou-se improvável a dimerização, pois a molécula de PQ é muito grande, o que dificultaria a reação, já que existe a cadeia alifática lateral ao nitrogênio ligado ao anel aromático. Além disto, o trabalho foi realizado em meio altamente nucleofílico (aquoso), e neste caso a dimerização não é favorecida.

Objetivando-se a determinação do número de elétrons, foram feitos experimentos cronamperométricos. As informações obtidas, juntamente com os dados dos demais experimentos, indicaram o envolvimento de 1 elétron na etapa eletroquímica determinante do processo. Os dados voltamétricos forneceram então subsídios para a proposição do envolvimento posterior de mais 3 elétrons e 3 prótons em outra etapa, posterior a uma etapa química intermediária. Finalmente, ocorreria uma etapa química final. Portanto, ter-se-ia um processo do tipo ECEC.

Os efeitos de adsorção, principalmente dos produtos de oxidação da PQ na superfície do ECV, incentivou-nos a utilizar eletrodos de diamante dopado com boro, devido à sua propriedade de sofrer pouco ou nenhum efeito adsorativo, no desenvolvimento de um método eletroanalítico para determinação da PQ. De fato não se observou adsorção sobre o EDDDB, e sim apenas a presença de um filme na região da superfície do eletrodo, problema resolvido de maneira simples e rápida, com agitação da solução, o que não é possível com o ECV. Assim tornou-se possível efetuar a determinação de PQ por voltametria de pulso diferencial.

Vislumbrou-se então a oportunidade de se trabalhar com os eletrodos de diamante esféricos, na tentativa de se melhorar ainda mais o limite de detecção e/ou a resposta do eletrodo. No entanto, o que se observou com este eletrodo não foi significativamente diferente daquilo que se obteve com os eletrodos planos, trabalhando-se em soluções com o par redox ferri/ferrocianeto de potássio. Porém, uma nova perspectiva se abriu quanto à possibilidade de modificação destes eletrodos esféricos, pois se comparou os eletrodos plano e esférico (EEDDB), e constatou-se que o EEDDB, por possuir buracos em sua estrutura (originários do processo de pré-tratamento do substrato de molibdênio), apresenta características de retenção do material estudado, ao longo das medidas. Isto sugere que estes eletrodos podem sofrer modificação química, por substâncias que sejam de interesse, para utilização nos mais variados tipos de determinação. Por outro lado, a miniaturização deste eletrodo facilita seu emprego em diferentes meios de análise.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material

3.1.1. Reagentes

Os reagentes de grau analítico utilizados ao longo do trabalho experimental, sem tratamento prévio, foram: ácido acético, ácido orto-fosfórico, ácido bórico, nitrato de potássio, ferrocianeto de potássio, hidróxido de sódio, etanol absoluto, tetra-*n*-butilamônio tetrafluoroborato (TBATFB), PIPES, foram adquiridos da Merck e *m*-anisidina da Aldrich. Primaquina, marca Itacá Laboratórios, foi obtida por doação do Prof. Dr. Mauro Aquiles La-Scalea, Unifesp. 5-HPQ, origem Organização Mundial de Saúde, foi obtida por doação da Profa. Dra. Ohara Augusto, USP. *N-N*-dimetilformamida, marca Merck, foi obtida por doação do Prof. Dr. João Valdir Comasseto. Os comprimidos de primaquina, produzidos no laboratório Farmanguinhos / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, foram doados pela Dra. Shirley Trajano. O gás nitrogênio foi adquirido da Air Products, São Paulo. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida de deionizador Barnsted Nanopure[®].

3.1.2. Soluções estoque de tampão Britton-Robinson (BR)

As soluções de tampão foram preparadas a partir da neutralização de uma solução contendo ácido orto-fosfórico, ácido acético e ácido bórico, todos $0,40 \text{ molL}^{-1}$, com volume suficiente de solução de NaOH, $2,0 \text{ molL}^{-1}$, de acordo com Britton & Robinson [70]. O pH final de cada solução tampão foi medido com pHmetro Metrohm[®], modelo 713 e eletrodo de vidro Metrohm[®].

3.1.3. Solução estoque de tampão PIPES

A solução de tampão PIPES [71] foi preparada a partir da dissolução de 29,8810 g do composto em água deionizada, e posterior ajuste do pH com solução de NaOH, $0,50 \text{ molL}^{-1}$, contendo TBATFB, $0,20 \text{ molL}^{-1}$. O ajuste de força iônica foi feito com nitrato de sódio, $0,30 \text{ molL}^{-1}$. O pH final da solução (7,43) foi medido com pHmetro Metrohm[®], modelo 713 e eletrodo de vidro Metrohm[®].

3.1.4. Solução estoque de primaquina

As soluções estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de primaquina foram preparadas por dissolução direta de quantidade apropriada do composto em água deionizada. As soluções foram estocadas em frasco âmbar, sob refrigeração, por no máximo duas semanas.

3.1.5. Solução estoque de 5-HPQ

A solução de 5-HPQ, $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, foi preparada pela dissolução de quantidade suficiente do composto em 5 mL ou 10 mL de água deionizada, para posterior adição à célula eletroquímica, contendo o tampão em pH de interesse.

3.1.6. Solução estoque de m-anisidina

A solução de *m*-anisidina foi preparada pela diluição de 2,32 μL do composto líquido diretamente na célula eletroquímica contendo o tampão de interesse. Normalmente as concentrações empregadas foram de $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$. Os cálculos foram feitos considerando-se a baixa miscibilidade do reagente em água.

3.1.7. Solução estoque de ferrocianeto de potássio

As soluções estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ de ferrocianeto de potássio, quando necessárias, foram preparadas instantes antes da utilização, pela dissolução de 0,1056 g do composto em 25 mL de água deionizada, contendo KNO_3 , $1,0 \text{ molL}^{-1}$, escolhido como o eletrólito suporte.

3.2. Equipamentos e sistema de eletrodos

3.2.1. Medidas voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato Eco Chemie[®] Autolab PGStat20, com *software* GPES 4.9 para aquisição e tratamento de dados, ao qual estava acoplada uma célula de trabalho de 30 mL de capacidade, para uso com sistema de três eletrodos, trabalho, referência e auxiliar.

3.2.2. Sistema de eletrodos

Os eletrodos de trabalho utilizados foram:

- 1 – Eletrodo de carbono vítreo, marca Analion, $\theta = 2,0$ mm, tratado por polimento com partículas de diamante em suspensão (3,0 μm e 1,0 μm , respectivamente), seguido por polimento com alumina (1,0 μm e 0,3 μm , respectivamente) sobre feltro metalográfico. Posteriormente lavado com etanol, água e solução tampão, separadamente, em ultrassom por 5 minutos, antes de cada medida, somando um total de 20 minutos para cada limpeza;
- 2 – Microeletrodo de carbono vítreo (μECV), marca BAS, $\theta = 11$ μm , tratado por polimento com *spray* de diamante (3,0 μm e 1,0 μm , respectivamente) sobre feltro metalográfico, seguido de lavagem com etanol, água e solução tampão, separadamente, em ultrassom por 1 minuto, antes de cada medida;
- 3 – Eletrodos de diamante dopado com boro, plano (EDDB) ou esférico (EEDDB), montados no próprio laboratório com filmes crescidos no INPE. Os eletrodos foram lavados apenas com água e solução tampão, antes de cada medida.

Como eletrodos de referência e auxiliar, foram usados Ag/AgCl , KCl_{sat} e fio de platina, respectivamente. Estes eletrodos foram lavados com etanol e água, antes de cada medida. Um aparelho de ultrassom da marca Ney, modelo Ultrasonik 28H, frequência do aparelho 50/60 Hz, potência 150 W (máxima potência para uso com o μECV , segundo alerta do fabricante), foi empregado durante a lavagem dos eletrodos.

3.2.3. Célula eletroquímica

A célula eletroquímica foi lavada com etanol absoluto e água, antes de cada medida voltamétrica, para evitar contaminação por qualquer um dos analitos utilizados, bem como para se obter uma linha base estável e reprodutível de branco (solução tampão BR).

3.2.4. Montagem dos eletrodos de diamante

Os filmes planos de diamante dopado com boro foram crescidos sobre silício, pelo método de deposição química a partir da fase vapor (do inglês “Chemical Vapour Deposition” – sigla CVD). Utilizou-se reator assistido por filamento quente de tungstênio, em condições previamente descritas [55,61] e o nível de dopagem dos filmes utilizados foi de 10^{21} átomos cm^{-3} . Na Figura 10 vê-se fotomicrografias de um filme de diamante dopado, de superfície (**A**) e lateralmente (**B**), onde se percebe a granulometria típica deste tipo de material. A espessura dos filmes depende dos parâmetros de crescimento e foi atingida, em no mínimo $6 \mu\text{m}$, para permitir a montagem posterior dos eletrodos, sem delaminação nem quebra do diamante. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura foi feita em equipamento Zeiss DSM 950, no INPE.

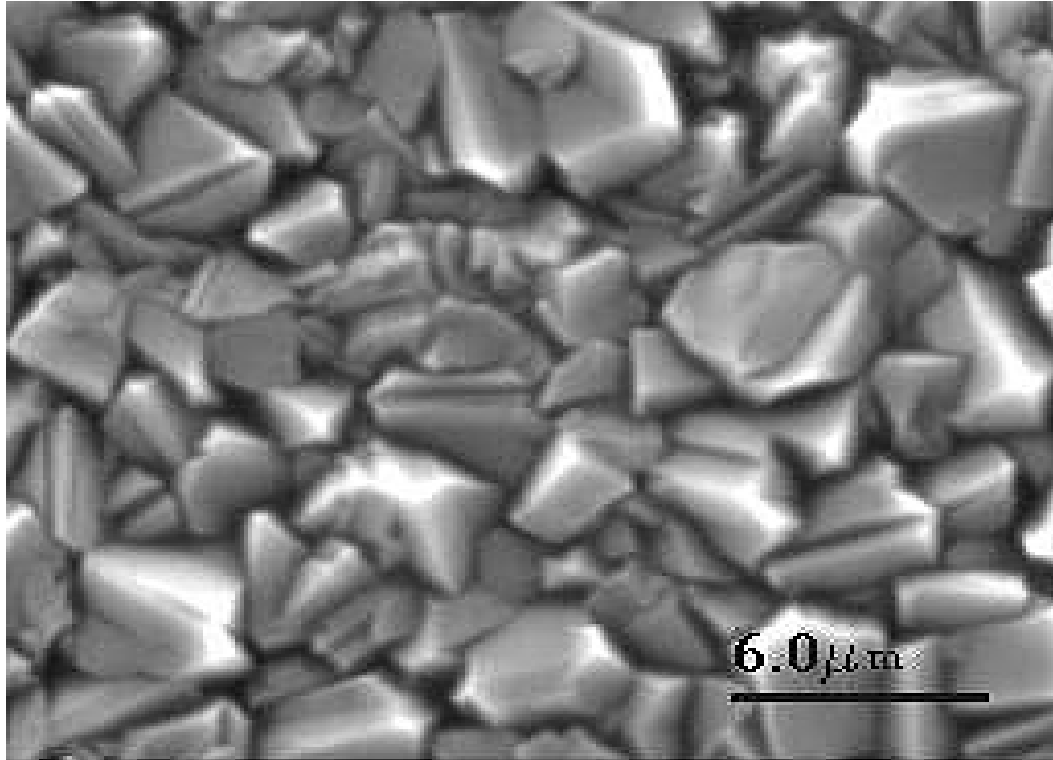


Figura 10A: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura, mostrando a superfície de um filme de diamante dopado com boro crescido sobre silício.

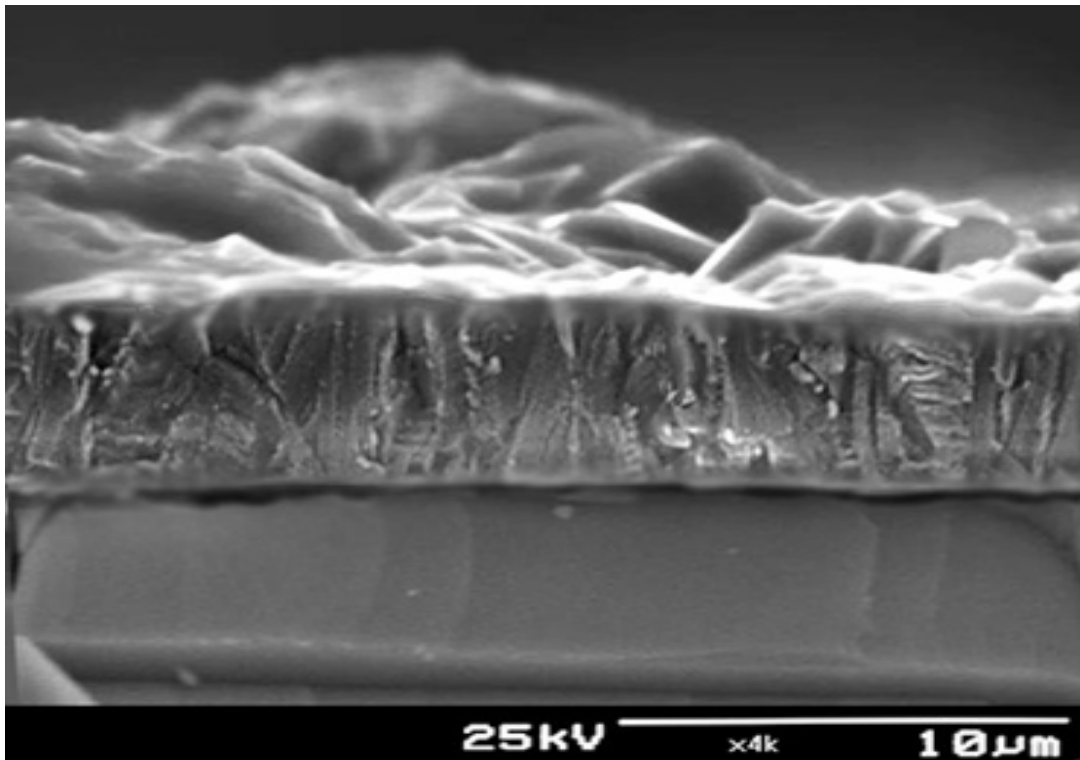


Figura 10B: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura, mostrando a lateral do filme de diamante dopado com boro crescido sobre silício.

A montagem dos eletrodos planos foi feita no próprio laboratório, colando-se as amostras de filme de diamante com cola de prata coloidal sobre uma base de latão embutida em teflon, fazendo-se a vedação do conjunto com borracha de silicone, como pode ser visualizado na Figura 11. O sistema mostrou-se eficiente, não havendo infiltrações nem descolamento. Mas, ao longo do tempo, após algum tempo de uso, é necessário trocar a borracha de silicone ou fazer novamente o contato. A área final do eletrodo varia de acordo com a montagem e seu cálculo será descrito posteriormente.

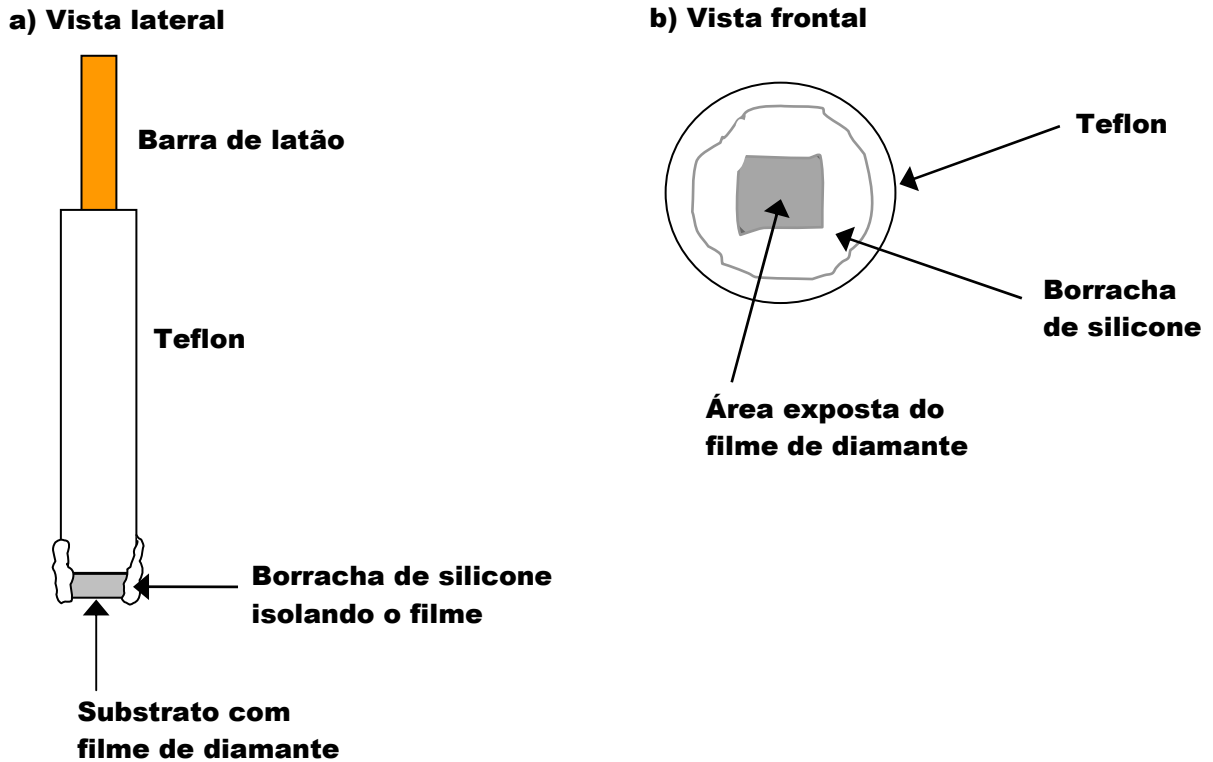


Figura 11: Esquema de montagem do eletrodo de diamante.

O eletrodo esférico de diamante foi crescido sobre um substrato de molibdênio (broca de dentista), adaptado para tal finalidade, com parâmetros de crescimento pré-estabelecidos [57,72]. Na Figura 12 pode-se ver o formato do filme, bem como o substrato usado para crescer-lo. O filme esférico foi montado dentro de uma ponteira de pipeta, de modo que somente o hemisfério ficasse em contato com a solução e sua parte posterior permanecesse totalmente isolada. O contato foi feito com fios de cobre, fixados à parte metálica da haste por cola de prata coloidal. O isolamento da ponteira foi feito com borracha de silicone.

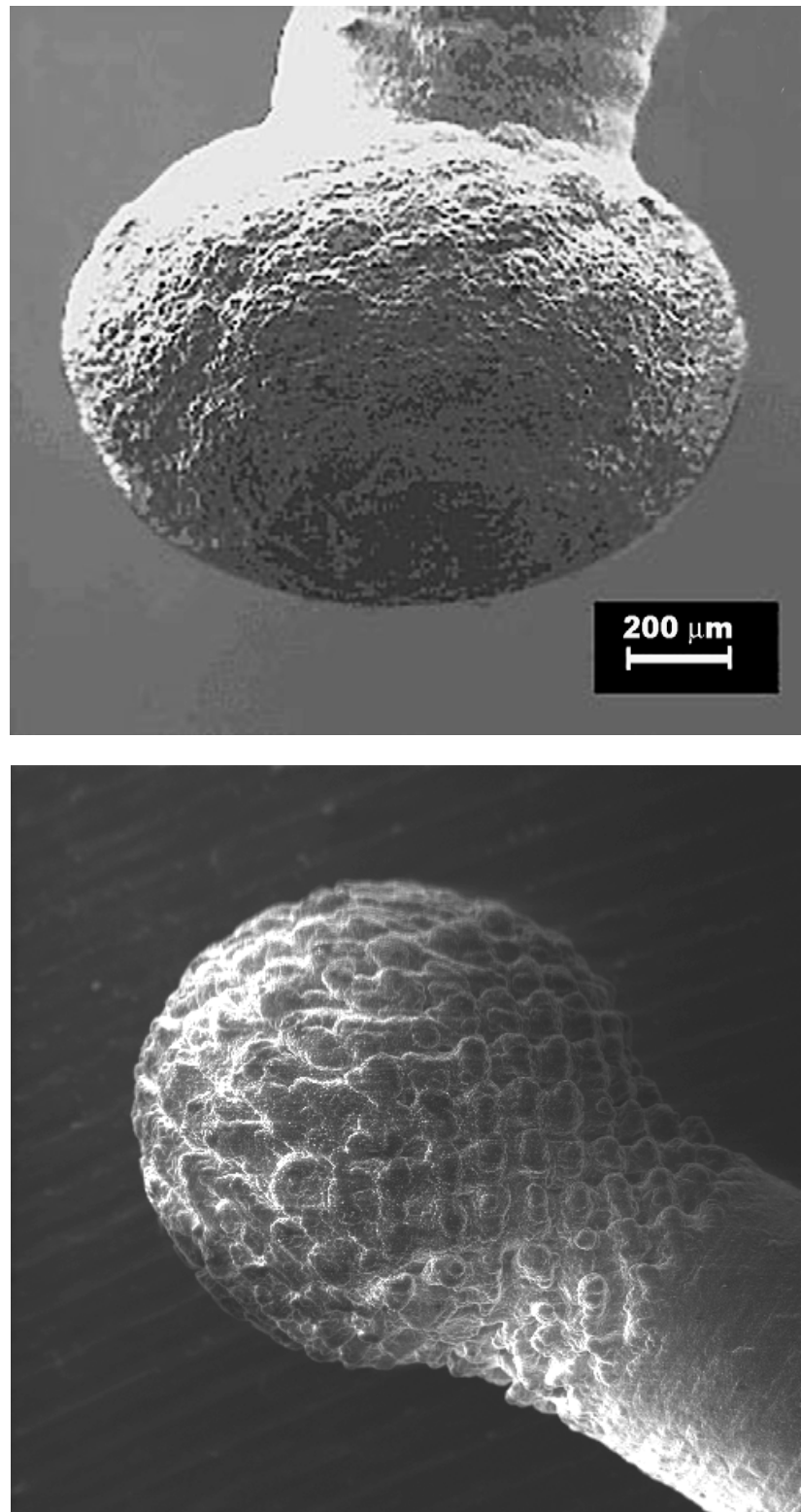


Figura 12: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura, mostrando acima um filme de diamante dopado com boro crescido sobre substrato esférico de molibdênio, e abaixo o substrato usado no crescimento, onde nota-se uma parte da haste, com comprimento total de aproximadamente 2 cm.

3.3. Procedimentos experimentais

As técnicas escolhidas para realização dos experimentos visaram a obtenção dos melhores resultados, considerando-se os materiais utilizados e os reagentes disponíveis para tal. Como trabalhou-se o tempo todo com compostos orgânicos, optou-se por técnicas relativamente rápidas, que não implicassem em processos de adsorção muito eficientes dos subprodutos, os quais normalmente bloqueiam a resposta dos eletrodos. Exceção foi feita quando da utilização de ECV, onde os processos de adsorção foram fundamentais para a proposição das possíveis etapas de oxidação da PQ.

3.3.1. *Voltametria cíclica em solução de PQ*

Para o registro dos voltamogramas cíclicos referentes ao branco, solução tampão BR nos respectivos pH escolhidos, transferiu-se à célula quantidade suficiente do tampão, para posterior adição dos analitos. Foram feitas pelo menos 10 ciclagens, a cada medida, para estabilização da linha base, sem borbulhamento de qualquer gás, com exceção do experimento em que se testou o efeito da eliminação de oxigênio, quando o borbulhamento de nitrogênio foi feito por 10 minutos antes de cada leitura, sob agitação, para evitar-se a presença de oxigênio. A agitação era então desligada ao registrar-se o voltamograma.

Em seguida, adicionava-se o analito, em quantidade suficiente para obtenção da concentração desejada, que variou em função do volume preparado de solução. Em geral, trabalhou-se com 9 mL de solução tampão e 1 mL de solução estoque de PQ, para obtenção de uma solução final de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em PQ. A concentração de PQ variou de acordo com o experimento, de $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. A velocidade de varredura variou de 0,020 a $1,0 \text{ Vs}^{-1}$; a janela de potencial, de $E_i = 0,0 \text{ V}$; $E_\lambda = + 1,3 \text{ V}$; $E_f = 0,0 \text{ V}$ (pH 2,15) ou $E_i = - 0,5 \text{ V}$; $E_\lambda = + 1,3 \text{ V}$; $E_f = - 0,5 \text{ V}$ (pH 7,40).

3.3.2. *Voltametria de pulso diferencial (VPD) em solução de PQ*

Os voltamogramas de pulso diferencial foram inicialmente registrados na solução do eletrólito suporte, para estabilização da linha base, nas mesmas condições em que seriam feitas as medidas posteriormente, nas soluções contendo o analito de interesse. Os parâmetros experimentais utilizados foram: velocidade de varredura: 10 mVs^{-1} (na determinação analítica) ou 5 mVs^{-1} (para determinação do número de elétrons envolvidos no processo); amplitude de pulso: $0,06 \text{ V}$; intervalo de pulso: 1 s ; tempo de equilíbrio: 25 s ; $E_i = + 0,4 \text{ V}$; $E_f = + 1,0 \text{ V}$. A concentração de PQ, nestes experimentos, variou de $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, dependendo do eletrodo utilizado. Quando o eletrodo de trabalho foi o ECV, foi necessário efetuar a limpeza superficial como descrita no item 3.2.2., após cada voltamograma registrado, devido ao forte efeito de adsorção. Em se tratando do eletrodo de diamante, a simples agitação da solução promovia, de forma eficaz, a renovação da superfície.

3.3.3. *Cronoamperometria em solução de PQ*

A técnica cronoamperométrica foi usada para determinação experimental do número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da PQ. Neste caso, trabalhou-se unicamente com μECV , em uma concentração de PQ de $1,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, para que corrente faradaica pudesse ser discriminada da corrente capacitiva. Os experimentos foram realizados dentro de uma gaiola de Faraday. Trabalhou-se com tampão pH 7,40, empregando-se os seguintes parâmetros experimentais: número de pulsos de potencial: 2; nível 1: potencial 0 V , duração 2 s , tempo de amostragem $0,01 \text{ s}$; nível 2: potencial $0,62 \text{ V}$, duração 5 s , tempo de amostragem $0,01 \text{ s}$. Os pontos de corrente utilizados nos cálculos foram tomados a partir do pico de potencial (I_d), até o início da linha de corrente limite ($I_{d,ss}$).

3.3.4. Cálculo do coeficiente de difusão da PQ

Para o cálculo do coeficiente de difusão (**D**) da PQ, utilizou-se o método de Wilke-Chang [73]. O valor de **D** foi posteriormente empregado no cálculo do número de elétrons do processo de oxidação da PQ.

Inicialmente, calculou-se o volume molar do composto, assumindo-se a contribuição individual de valores tabelados atribuídos a átomos e grupos, presentes na molécula de PQ.

Tendo em mãos o valor do volume molar, calculou-se o coeficiente de difusão **D**, pela equação 1 [73]:

$$D = 7,4 \times 10^{-8} \cdot \frac{T \sqrt{xM}}{\eta V^{0,6}} \quad \text{Equação (1)}$$

onde **D** é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), **T** é a temperatura absoluta (K), **x** é o coeficiente de associação do solvente (2,6 e 1,0, para água e DMF respectivamente), **M** é a massa molecular do composto (g mol^{-1}), **η** é a viscosidade do solvente (cP) e **V** o volume molar ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$).

O volume molar encontrado para a PQ foi de $315,2 \text{ cm}^3 \text{mol}^{-1}$. Este dado não difere significativamente do valor encontrado em estudos de modelagem molecular realizados pelo grupo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, participante do Projeto Temático Fapesp [34], que foi $337,89 \text{ cm}^3 \text{mol}^{-1}$, portanto, implicando em um erro de aproximadamente 6,7 % entre os valores.

O cálculo de **D** foi realizado para meio aquoso e meio aprótico, de DMF e sal quaternário de amônio, obtendo-se os valores de $5,37 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ e $1,60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$, respectivamente.

3.3.5. Cálculo do número de elétrons envolvidos no processo

Utilizou-se, neste caso, diferentes equações, dependendo do método usado para comparação. Por voltametria cíclica, empregou-se a equação de Randles-Ševčík [38]:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \, n^{3/2} \, A \, C_0 \, D^{1/2} \, v^{1/2} \quad \text{Equação (2)}$$

onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C_0 é a concentração inicial do reagente (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

O coeficiente angular obtido do gráfico de I_p em função de v , pode ser substituído na equação acima, e fornece o valor do número de elétrons envolvidos no processo.

Quando empregou-se a cronoamperometria, utilizou-se a equação [38]:

$$I_{d,ss} = 4 \, n \, F \, D \, C \, r \quad \text{Equação (3)}$$

onde $I_{d,ss}$ é a corrente limite (A), n é o número de elétrons, F é constante de Faraday (cm^2), D é o coeficiente de difusão da PQ ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C é a concentração inicial do reagente (mol cm^{-3}), e r é o raio do microeletrodo (cm). Encontra-se no cronoamperograma o valor de $I_{d,ss}$, e calcula-se assim o valor de n .

Por VPD, a equação usada no cálculo do número de elétrons foi [47]:

$$W_{1/2} = 0,090 \, n \quad \text{Equação (4)}$$

onde $W_{1/2}$ é a largura à meia altura do pico observado no voltamograma, e n é o número de elétrons.

3.3.6. Cálculo da área real dos eletrodos de diamante

A área real de eletrodos policristalinos, que é o caso dos eletrodos de diamante dopado usados neste trabalho, chega a ser de 2 a 3 vezes maior que sua área geométrica [74]. Portanto, é necessário que se calcule a área efetiva dos eletrodos de diamante, a qual estará disponível para a ocorrência dos processos eletródicos.

Assim, utilizando voltametria cíclica e diversas velocidades de varredura, mantendo-se constante a concentração da espécie eletroativa, é possível construir um gráfico de I_p em função de $v^{1/2}$ e, através do coeficiente angular, calcular a área do eletrodo através da equação de Randles-Ševčík.

Optou-se pela utilização de solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de ferrocianeto de potássio, em presença de KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$, como solução padrão, pois se conhece o número de elétrons envolvidos nesta reação redox. Inicialmente foram registrados voltamogramas somente no eletrólito suporte, para estabilização da linha base e, em seguida, registraram-se voltamogramas na solução de ferrocianeto de potássio, utilizando-se os seguintes parâmetros: velocidade de varredura no intervalo de 0,020 a $1,0 \text{ Vs}^{-1}$ e janela de potencial de $E_i = 0,0 \text{ V}$; $E_\lambda = + 1,3 \text{ V}$; $E_f = 0,0 \text{ V}$.

Para o eletrodo esférico, a equação utilizada foi [38]:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \text{ n}^{3/2} \text{ A C}_0 \text{ D}^{1/2} v^{1/2} + (0,725 \times 10^5 \text{ n A C}_0 \text{ D})/r$$

Equação (5)

diferente da equação 2, por ser aplicada a eletrodos esféricos. Aqui, r é o raio do eletrodo.

3.3.7. *Cálculo da capacitância dos eletrodos*

Com o objetivo de se avaliar a diferença real entre as ordens de grandeza das correntes de fundo dos diferentes eletrodos, calculou-se a capacitância de cada um. Para isto foram usados os voltamogramas registrados no sentido anódico, em solução de nitrato de potássio $1,0 \text{ molL}^{-1}$. Os pontos dos voltamogramas referentes ao sentido anódico de varredura foram isolados dos pontos do sentido catódico (cerca de 150 pontos em cada sentido de varredura de potencial). Em seguida, estes valores foram divididos pela área de cada eletrodo e pela velocidade de varredura utilizada nos experimentos, e os resultados foram tomados em seu valor absoluto, obtendo-se assim a capacitância para cada eletrodo:

$$C_d = |i_c| / A v \quad \text{Equação (6)}$$

3.3.8. *Determinação analítica de PQ por voltametria de pulso diferencial*

As amostras comerciais de primaquina foram fornecidas com as seguintes características: forma de apresentação: comprimidos; concentração: 15 mg por comprimido. Como os métodos oficiais de determinação de primaquina sugerem trabalho em meio ácido, optou-se pela VPD em pH 2,15. As soluções tampão e estoque foram preparadas portanto neste pH.

Preparou-se uma solução padrão estoque, que foi utilizada nos experimentos para obtenção da curva analítica, cujas concentrações variaram no intervalo $8,0 \times 10^{-7} \leq [\text{PQ}] \leq 1,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Adicionou-se quantidade suficiente para obtenção da respectiva solução.

As determinações de PQ nos comprimidos comerciais foram realizadas em triplicata, pelo método de adição de padrão, a partir de 3 amostras diferentes, tomadas de 3 cartelas. Os comprimidos de PQ foram macerados, dissolvidos em solução tampão BR pH 2,15, e esta solução foi filtrada. Adicionou-se quantidade suficiente desta solução à célula eletroquímica

de 15 mL, para se obter uma concentração final aproximada de $2,2 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em PQ. A partir desta concentração de amostra, fizeram-se as adições de padrão. A concentração inicial de padrão, na célula eletroquímica, foi de $2,3 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, e variou até $3,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Partiu-se de uma solução estoque de PQ de concentração $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, da qual retiraram-se alíquotas de 200 μL as quais eram adicionadas à célula. As condições experimentais da voltametria de pulso diferencial foram: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V.

O teste de recuperação foi realizado adicionando-se às soluções das amostras, cujas concentrações eram conhecidas em função do método utilizado, concentrações conhecidas de analito, dentro da mesma ordem de grandeza de concentração das matrizes. Descontou-se então, dos resultados finais de cada amostra, o valor presente originalmente na amostra, de modo a obter o valor de recuperação frente ao padrão adicionado. O limite de detecção foi obtido da equação da reta:

$$LD = 3SD_{\text{branco}} / y_B$$

onde SD_B é o desvio padrão do branco, e y_B é o coeficiente angular da curva analítica [75].

A sensibilidade do método foi calculada dividindo-se o coeficiente angular da curva de adição padrão pela área do eletrodo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento eletroquímico da primaquina registrado com eletrodos de carbono vítreo (ECV) e diamante dopado com boro (EDDB)

Até o momento da escrita desta tese, os dados disponíveis a respeito da oxidação eletroquímica da PQ eram:

- estimativa de 2 elétrons envolvidos no processo de oxidação [33];
- 1 pico de oxidação principal da PQ e um par redox que se desloca em função do pH [33];
- informações sobre o ciclo de biotransformação de PQ a metabólitos [23,33];
- valores de pK_a e equilíbrio de dissociação ácido-base [33].

Não há mecanismo de oxidação proposto, para oxidação eletroquímica da PQ, etapa importante para se estudar seu mecanismo de ação como fármaco. Portanto, o trabalho se iniciou pelo estudo do comportamento eletroquímico da PQ por voltametria cíclica, com eletrodos de carbono vítreo e diamante dopado, avaliando dados como variação de corrente de pico em função da velocidade de varredura, variação de potenciais de pico, presença de pares redox, presença de processos reversíveis e/ou irreversíveis, ocorrência de processos adsorptivos, por exemplo.

Na avaliação dos dados voltamétricos obtidos por voltametria cíclica, foram utilizados os seguintes critérios [76]: • I_p vs $v^{1/2}$ – relação linear, para processo eletródico controlado por difusão; • I_p vs v – relação linear, para processo eletródico controlado por adsorção; • $\log(I_p)$ vs $\log(v)$ – relação linear, com inclinação de reta $\sim 0,5$, processo difusivo; • $\log(I_p)$ vs $\log(v)$ – relação linear, com inclinação de reta $\sim 1,0$, processo adsorptivo; • $(I_p / C \cdot v^{1/2})$ vs v – decrescente, para processo com reação acoplada anterior ao processo eletroquímico.

4.1.1. Eletrodo de carbono vítreo (ECV)

Na Figura 13 são apresentados os voltamogramas cíclicos registrados com o ECV, em soluções de pH 2,15, à velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} .

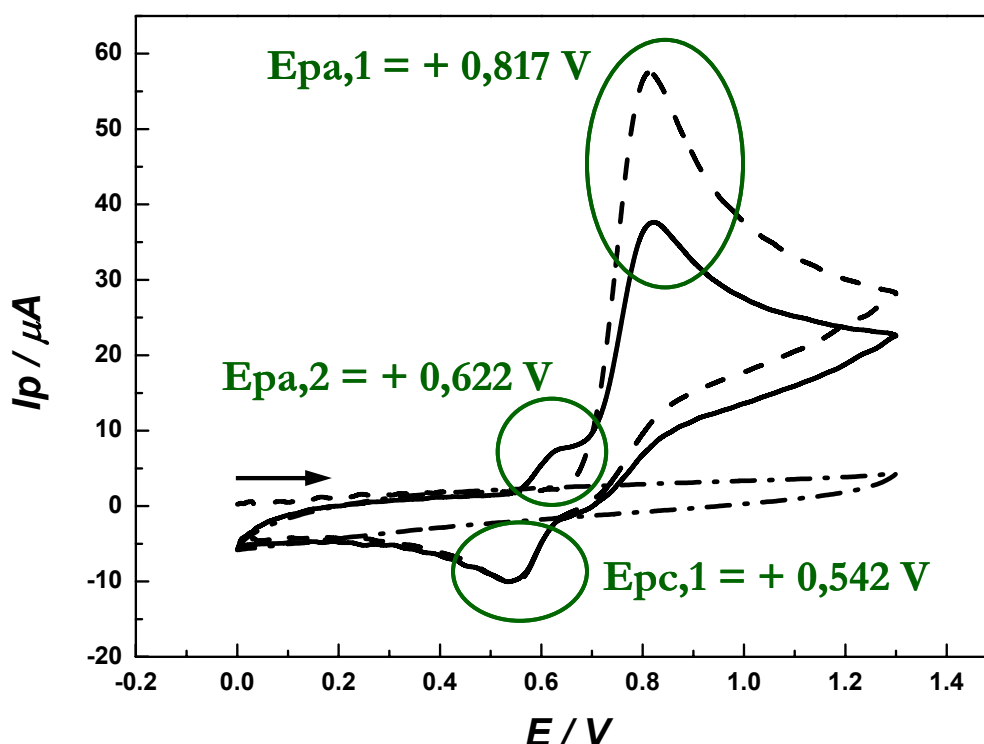


Figura 13: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson; pH 2,15, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. ----- : 1ª varredura; ———— : 3ª varredura; - • - • - • - • - • - : branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras.

O pico em $E_{pa,1}$ é o pico de oxidação principal da PQ, no sentido direto do voltamograma. No sentido inverso, catódico, $E_{pc,1}$ é o pico de redução, de um produto formado pela oxidação da primaquina, o qual estabelece um par redox com $E_{pa,2}$, em potencial menos positivo que o potencial de oxidação da PQ. É importante ressaltar que estes voltamogramas se referem à primeira e à terceira varreduras de potencial. Na primeira varredura, aparecem so-

mente os picos ($E_{pa,1}$) e ($E_{pc,1}$), para todos os valores de pH estudados. O pico ($E_{pa,2}$) só foi registrado a partir da segunda varredura, sendo portanto dependente de ($E_{pc,1}$), ou, indiretamente, de ($E_{pa,1}$). A queda de corrente que ocorre da 1ª para a 3ª varreduras pode ser explicada por limitações de transporte de massa, e não unicamente um efeito de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho. Com o passar do tempo, as condições iniciais de transporte das espécies oxidada ou reduzida, do seio da solução à região da superfície do eletrodo, não são mantidas para cada varredura sucessiva, acarretando em perda de sinal de corrente [38].

Nestes voltamogramas, o segundo potencial de inversão de varredura ($E_{\lambda 2}$) foi 0,0 V, uma vez que para potenciais mais negativos observou-se um brusco aumento da corrente de redução, devido à descarga de hidrogênio

A Tabela 2 lista os valores dos potenciais de pico e corrente de pico para pH 2,15, nas oito diferentes velocidades de varredura utilizadas, considerando-se o pico de oxidação da PQ e os picos ($E_{pc,1}$) e ($E_{pa,2}$). O aumento da velocidade de varredura desloca o pico da PQ para potenciais mais positivos, o pico de redução se desloca para potenciais mais negativos e o pico de oxidação ($E_{pa,2}$), para potenciais ligeiramente mais positivos.

Tabela 2. Variação nos potenciais e correntes de pico correspondentes ao processo de oxidação da PQ, em ECV, pH 2,15, como função da velocidade de varredura.

v (mVs^{-1})	$E_{pa,1}$ (V)	$I_{pa,1}$ (μA)	$E_{pc,1}$ (V)	$I_{pc,1}$ (μA)	$E_{pa,2}$ (V)	$I_{pa,2}$ (μA)
20	0,758	0,645	0,575	0,119	0,603	0,0310
40	0,790	0,724	0,561	0,194	0,616	0,0504
70	0,807	0,870	0,553	0,231	0,612	0,0681
100	0,817	1,11	0,542	0,299	0,622	0,0703
200	0,825	1,50	0,534	0,446	0,628	0,112
400	0,851	1,76	0,506	0,446	0,624	0,0393
700	0,857	2,27	0,491	0,631	0,645	0,0537
1000	0,885	1,79	0,478	0,494	0,646	0,0285

Foram feitos diferentes tratamentos de dados, para se avaliar se o processo envolvido em cada pico seria adsorptivo ou difusivo. A Figura 14 mostra a variação de corrente de pico de oxidação da PQ em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Observaram-se duas regiões lineares, uma para baixas velocidades e outra para altas velocidades de varredura. O comportamento global é o de um processo controlado por difusão.

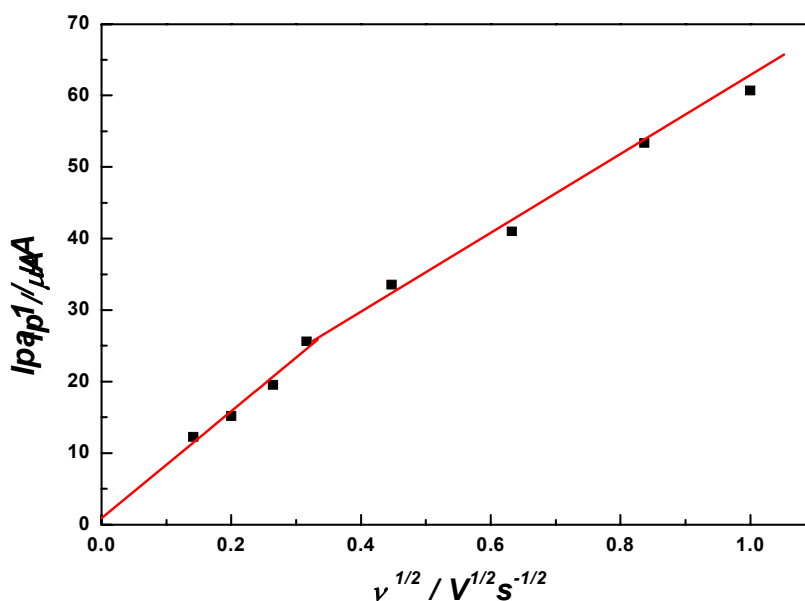
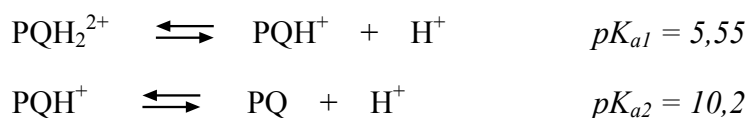


Figura 14: Variação de corrente de pico de oxidação da PQ ($I_{pa,1}$) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15. Sem limpeza do eletrodo entre as leituras.

A variação da função de corrente para $I_{pa,1}$ ($I_{pa,1} / C \cdot v^{1/2}$) com v , para pH 2,15, mostrou tendência de queda com o aumento da velocidade de varredura, o que estaria associado a um processo com reação química acoplada, anterior à reação eletroquímica, e que poderia se relacionar ao processo de desprotonação da PQ, já que neste valor de pH a PQ deve estar totalmente na forma diprotonada, PQH_2^{2+} [33]. Esta queda da função de corrente pode estar relacionada também a um processo que envolve a formação de cátion radical, e seu posterior decaimento, com formação de outra espécie eletroativa na mesma região de potencial [77].



Neste valor de pH, a variação de $\log(I_{pa,1})$ com $\log(v)$ para o pico ($E_{pa,1}$), apresentou aspecto semelhante à relação com $v^{1/2}$, linear, com inclinação que se aproxima do valor característico de processo difusivo (próximo de 0,5). A variação de ($I_{pc,1}$) como função de v (pico catódico) sugere um processo adsorptivo. Para o pico de oxidação, ($E_{pa,2}$), a mesma curva apresentou comportamento irregular à medida que a velocidade de varredura aumentou. Houve muita dificuldade de limpeza do eletrodo, em experimentos repetitivos, o que impediu que o ECV fosse limpo totalmente entre cada leitura, fato que sugere forte adsorção dos produtos de oxidação da PQ na superfície do eletrodo.

Como os dados de maior interesse para proposição de um mecanismo de oxidação se situam no pH 7,40, as informações obtidas neste valor de pH foram importantes em comparações com outros resultados publicados, que serviram de subsídio para a composição final do mecanismo [33].

Com o aumento do valor de pH, o processo de oxidação da PQ foi facilitado: $E_{pa,1}$ se deslocou para potenciais menos positivos. Porém dificultou-se o processo catódico ($E_{pc,1}$) e de seu respectivo par anódico ($E_{pa,2}$) [33].

Em pH 7,40, a oxidação da PQ foi de fato facilitada, em relação à oxidação em pH 2,15, o que pode ser verificado pela diminuição do potencial de oxidação de ($E_{pa,1}$) = + 0,788 V (pH 7,40) para ($E_{pa,1}$) = + 0,817 V (pH 2,15), enquanto o processo de redução observado em ($E_{pc,1}$) é dificultado, pois ($E_{pc,1}$) = - 0,160 V (pH 7,40) se desloca para ($E_{pc,1}$) = + 0,542 V (pH 2,15), como pode ser visto na Figura 15. No entanto, em pH 7,40 observou-se que, ao se reverter o potencial em ($E_{\lambda,2}$), obteve-se, além do componente anódico ($E_{pa,2}$), um pequeno ombro registrado em + 0,108 V (considerado um pós-pico), bem como um outro ombro (considerado um pré-pico), registrado em potencial mais positivo

que ($E_{pc,1}$). Estes dois picos podem estar associados a um processo adsorptivo das espécies formadas em $E_{pc,1}$ e $E_{pa,2}$ na superfície do eletrodo. Esta observação é corroborada pelos dados obtidos em pH 2,15, de dificuldade de limpeza mecânica do eletrodo.

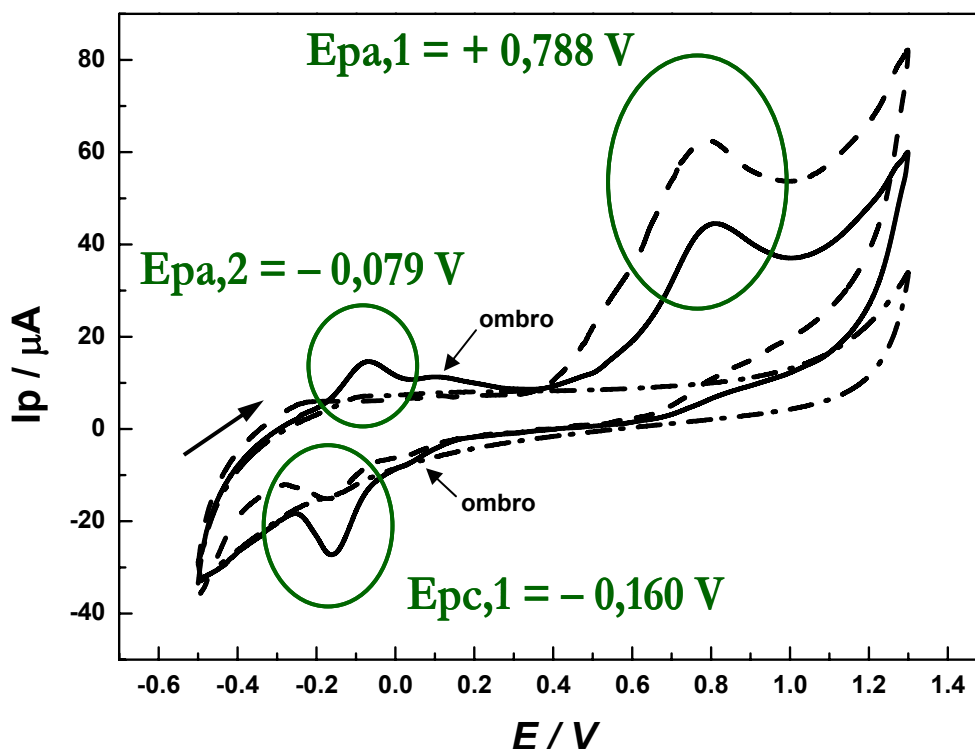


Figura 15: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, - - - - -: 1ª varredura, ———: 3ª varredura, - • - • - • - • - • -: branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras.

A Figura 16 apresenta a variação da corrente do pico de oxidação da PQ ($I_{pa,1}$) com $v^{1/2}$, em que se confirma que também em pH = 7,40 o processo é controlado por difusão. A variação de ($I_{pa,1}$) com v tem aspecto exponencial, como pode ser visto na Figura 17, confirmando o comportamento difusivo do processo registrado em $E_{pa,1}$.

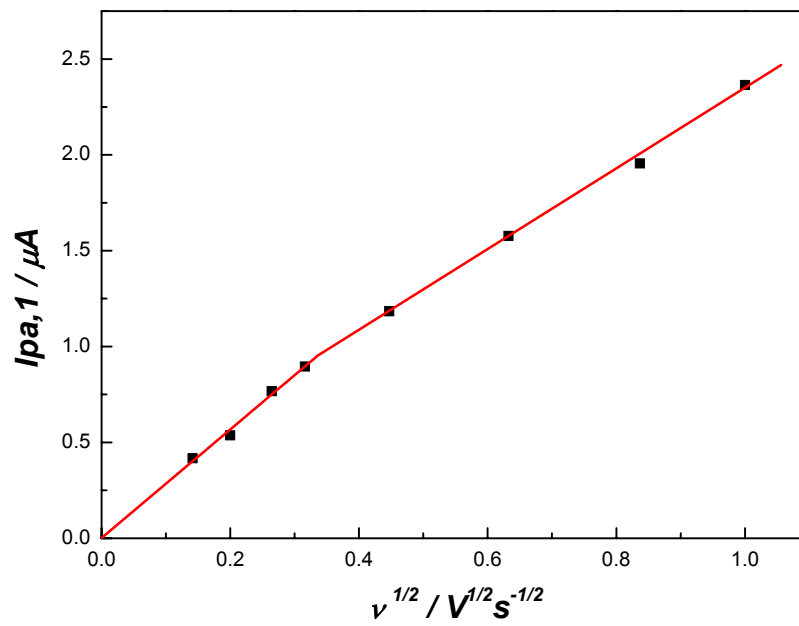


Figura 16: Variação da corrente de pico, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40.

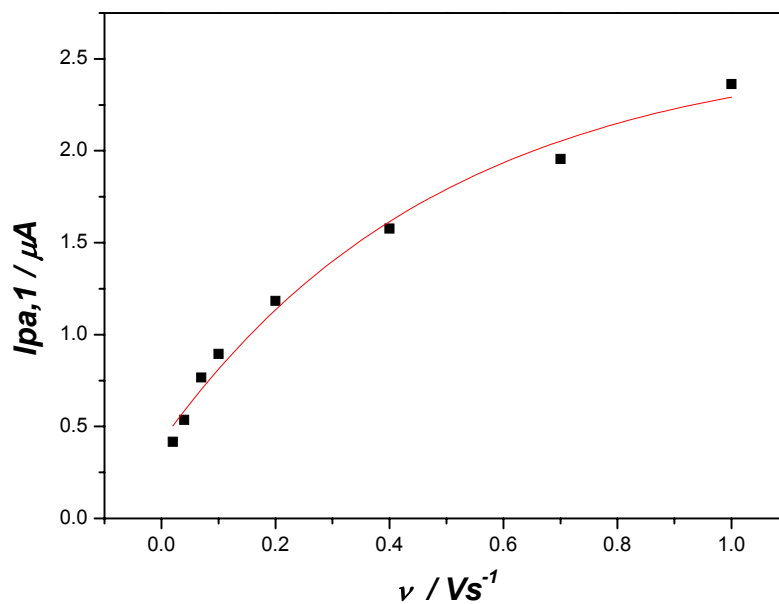


Figura 17: Variação da corrente de pico, $I_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40.

A variação da função de corrente de $I_{p,1}$ ($I_{p,1} / C \cdot v^{1/2}$) com v , neste pH, mostrou comportamento de queda constante, como pode ser visto na Figura 18.

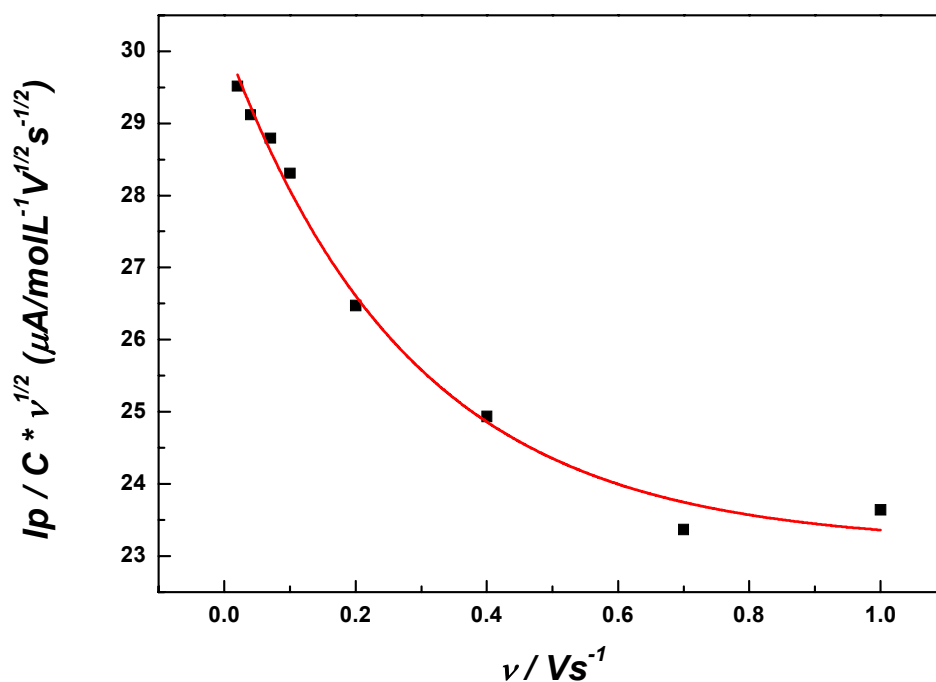


Figura 18: Variação da função de corrente de pico, $I_{p,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40. Dados referentes à Figura 16.

Para que a variação de função de corrente permaneça constante e independente de v (comportamento típico da maioria dos processos, inclusive dos irreversíveis), a corrente de pico deve crescer proporcionalmente ao aumento de v . Se isto não ocorre, uma reação química acoplada explicaria o aspecto decrescente da função, considerando-se que a etapa química seja lenta. Assim é que o critério de função de corrente decrescente em relação à velocidade de varredura é indicativo de processo com reação química acoplada, que pode ser a formação de cátion radical por oxidação anódica, com posterior decaimento em outra espécie eletroativa na mesma região de potencial, a qual sofrerá uma reação química [77].

A Tabela 3 lista a variação nos potenciais e correntes de pico para pH 7,40, nas oito diferentes velocidades de varredura estudadas, considerando-se o pico principal de oxidação da PQ (Epa,1), o par redox (Epc,1 e Epa,2) e os ombros considerados pós-pico e pré-pico.

Tabela 3. Variação nos potenciais e correntes de pico correspondentes ao processo de oxidação da PQ, em ECV, pH 7,40, como função da velocidade de varredura

v (mVs⁻¹)	Epa,1 (V)	Ipa,1 (μA)	Epc,1 (V)	Ipc,1 (μA)	Epc,pré (V)	Ipa,2 (μA)	Epa,2 (V)	Epa,pós (V)
20	0,686	0,417	- 0,141	0,0121	-	0,0350	- 0,095	-
40	0,769	0,537	- 0,139	0,101	-	0,0621	- 0,081	-
70	0,803	0,767	- 0,149	0,235	0,054	0,130	- 0,076	0,109
100	0,788	0,895	- 0,160	0,451	0,049	0,211	- 0,079	0,118
200	0,795	1,18	- 0,180	0,716	0,041	0,352	- 0,056	0,124
400	0,802	1,58	- 0,204	1,06	0,019	0,620	- 0,049	0,137
700	0,807	1,96	- 0,230	1,94	- 0,022	0,991	- 0,033	0,155
1000	0,827	2,36	- 0,252	2,21	- 0,059	1,26	- 0,020	0,189

Avaliando-se a variação do potencial de pico de oxidação principal da PQ, Epa,1, com a variação do pH, observou-se que para uma variação de 5,3 unidades de pH, o potencial de pico variou apenas de 29 mV, sugerindo que não haveria envolvimento de prótons neste processo, Figura 19. Nesta figura, o deslocamento de Epa,1 para valores mais positivos de potencial, com o aumento da velocidade de varredura, indica aumento da irreversibilidade do processo e reforça ainda mais a proposta de reação química acoplada ao processo eletroquímico, indicada pelos dados apresentados na Figura 18.

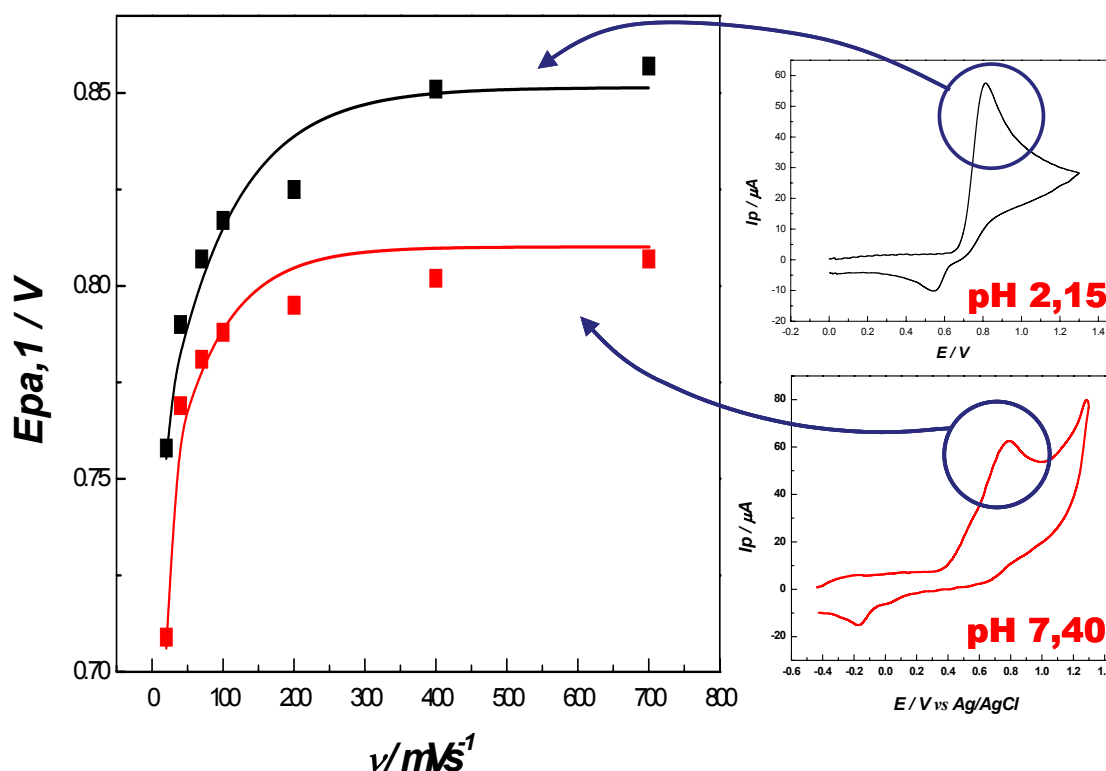


Figura 19: Variação do potencial de pico, $E_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pHs 2,15 (dados referentes à Tabela 2, pág. 77) e 7,40 (dados referentes à Tabela 3, pág. 83). Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} .

Trabalhando-se em pH 9,02, os resultados foram muito semelhantes aos encontrados para pH 7,40, com os potenciais de pico da PQ novamente se deslocando ligeiramente para valores menos positivos, com os potenciais do par redox se deslocando para valores mais negativos de potencial. Ou seja, o primeiro processo é ligeiramente facilitado, com o aumento do pH, ao passo que o segundo é dificultado. A variação da corrente de pico ($I_{pa,1}$) como função de $v^{1/2}$, em pH 9,02, apresentou a mesma relação linear apresentada em outros valores de pH estudados, indicando um processo controlado por difusão.

Partiu-se então para a avaliação dos picos referentes ao par redox. Como os resultados em pH 7,40 sugeriram um processo adsorptivo, foram feitos experimentos que pudessem com-

provar este fato. Voltamogramas cíclicos foram registrados em solução de PQ, por 20 ciclos seguidos, e em seguida, após lavagem do eletrodo com água, transferiu-se o ECV para uma solução contendo apenas o branco, tampão BR, onde novos voltamogramas foram registrados. Observou-se que, de fato, o par redox permaneceu na superfície eletrodo, já que os voltamogramas cíclicos registrados no branco apresentaram os picos referentes ao par, Figura 20.

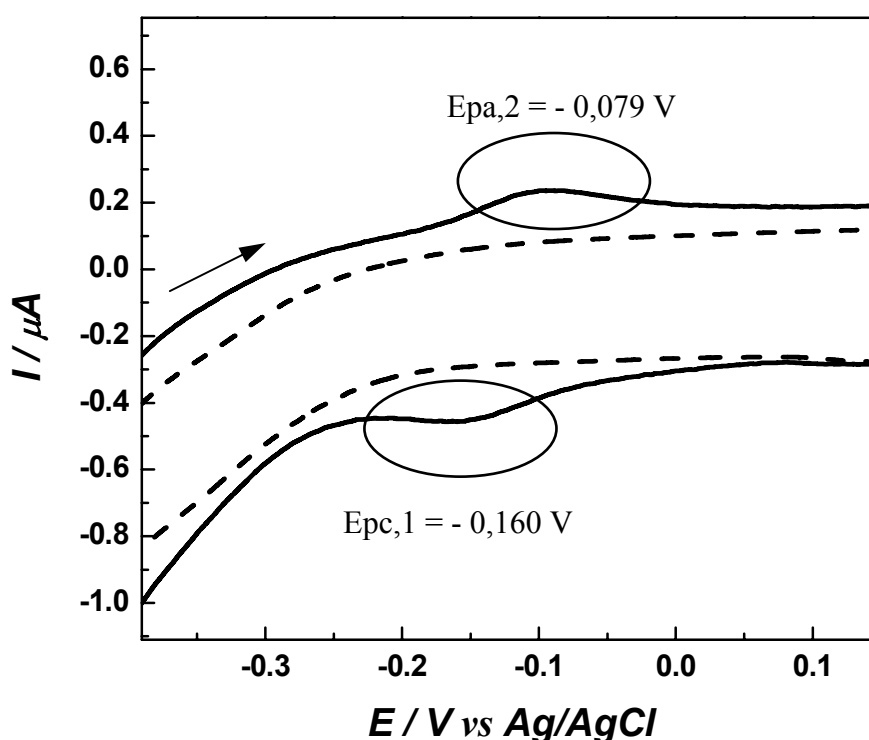


Figura 20: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, - - - - - : antes, e ——— : depois de 20 ciclos em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$.

Avaliando-se a variação dos potenciais de pico do par redox em função da velocidade de varredura e da variação do pH, observou-se que $E_{pc,1}$ e $E_{pa,2}$ são praticamente independentes de v , com os valores de $\Delta E_p/\text{pH}$ apresentando valores aproximados de 134 mV para ambos os picos (catódico e anódico), características estas indicativas de um processo quasi-reversível ($E_{pa,2} - E_{pc,1} = 81 \text{ mV}$), com envolvimento de prótons.

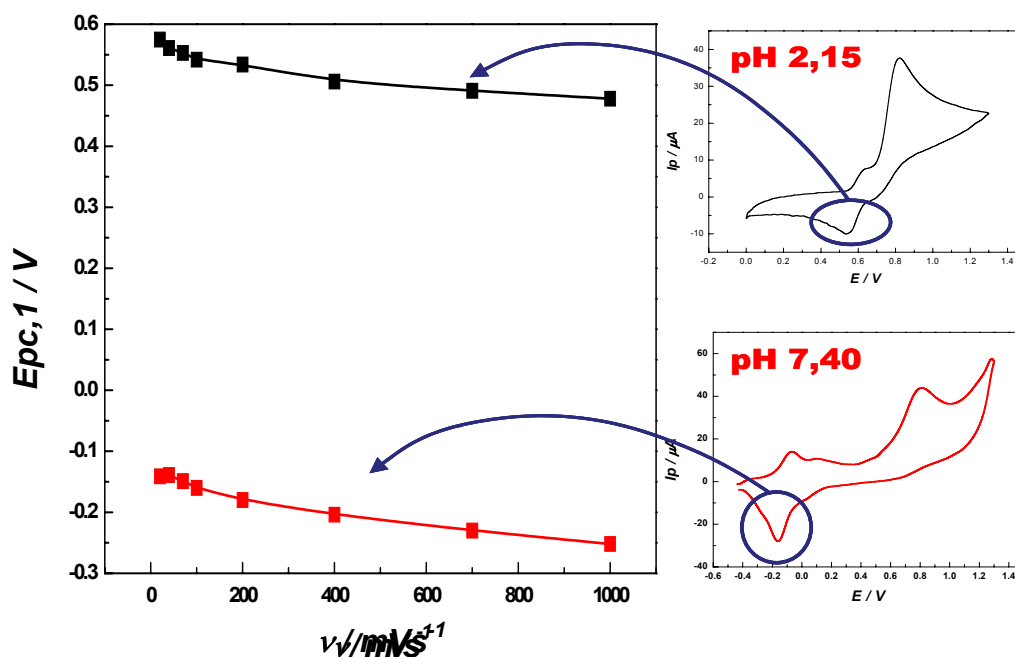


Figura 21: Variação do potencial de pico de redução, $E_{pc,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 mmolL^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, em pH 2,15 e 7,40. Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de $100mVs^{-1}$.

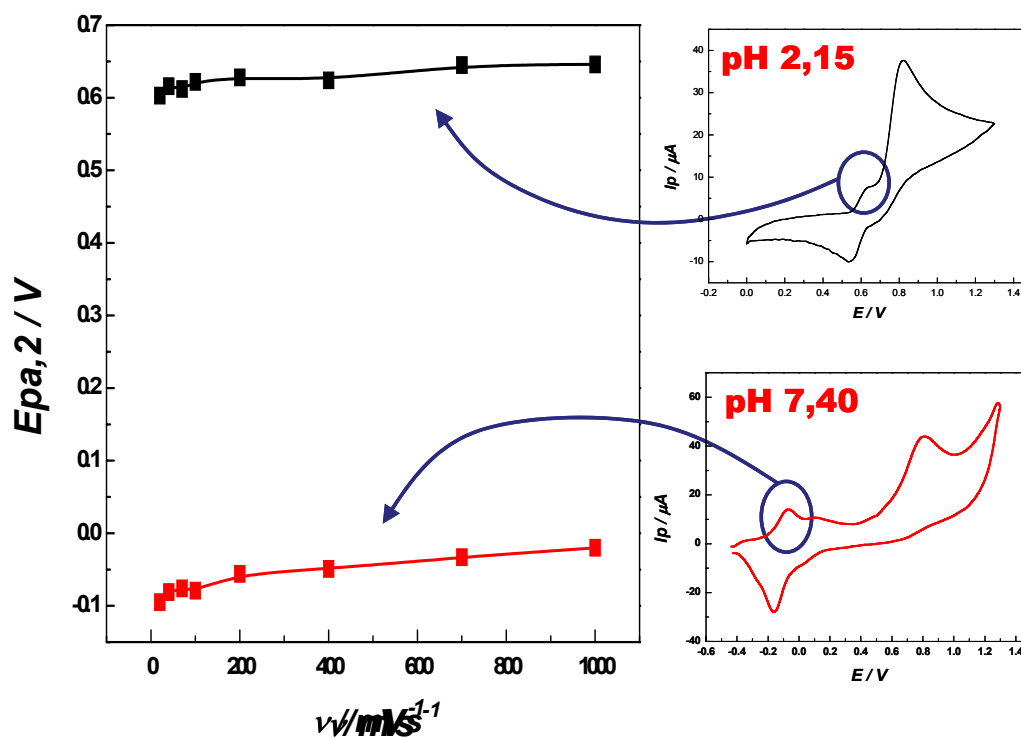


Figura 22: Variação do potencial de pico de oxidação, $E_{pa,2}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 mmolL^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, em pH 2,15 e 7,40. Em destaque, voltamogramas cíclicos registrados em pH 2,15 e 7,40 à velocidade de varredura de $100mVs^{-1}$.

As variações, tanto de $\log(I_{pc,1})$, ou $\log(I_{pa,2})$, em função de $\log(v)$, apresentaram inclinação típica de processo adsorptivo, ou seja, 1, como pode ser visto na Figura 23. Este é mais um dado na caracterização do comportamento adsorptivo deste par redox.

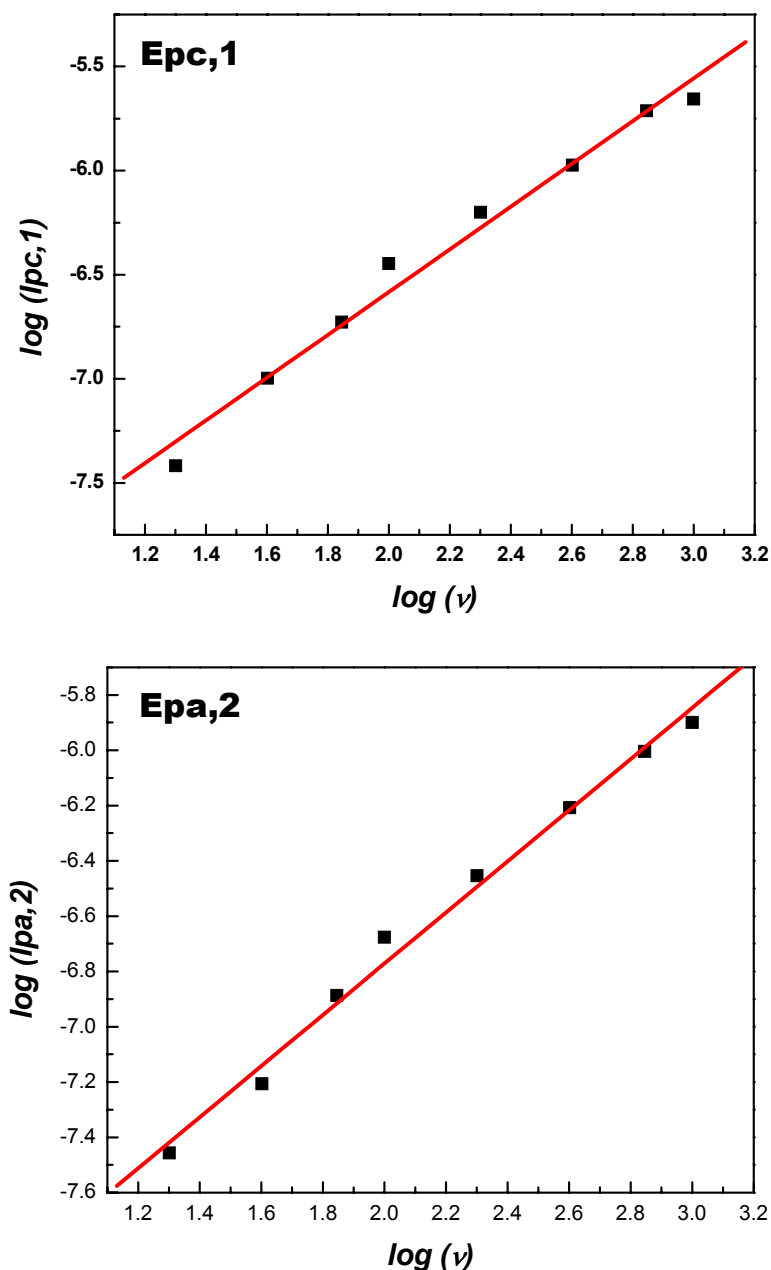


Figura 23: Variações do logaritmo das correntes de pico, $I_{pc,1}$ e $I_{pa,2}$, em função do logaritmo da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com eletrodo de carbono vítreo, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40.

Foram feitos experimentos que possibilitassem a confirmação de ocorrência de adsorção sobre a superfície do ECV. Trabalhou-se com 3 tipos de tratamento superficial com o ECV: ECV limpo, o qual foi mecanicamente polido e lavado em ultrassom entre cada leitura, para que praticamente todo o material adsorvido pudesse ser retirado; ECV não lavado, o qual não passou por qualquer processo de limpeza antes do registro de cada voltamograma; ECV modificado, o qual foi previamente submetido a 60 ciclos em solução de PQ, lavado simplesmente com água, e posteriormente usado para se fazer as medidas.

Confirmando os dados de adsorção do par redox sobre a superfície do ECV, o gráfico mostrado na Figura 24 corrobora as informações já discutidas, além de sugerir uma explicação para o fato de se observar comportamento adsorptivo quando o eletrodo não é limpo antes de cada leitura, como no caso dos experimentos em pH 7,40 (Figura 20).

Se o eletrodo é submetido ao processo de modificação superficial prévia, e só então é usado para leituras sucessivas em solução de PQ, o comportamento é muito semelhante àquele apresentado pelo eletrodo que não é lavado antes de cada registro dos voltamogramas.

Portanto, ocorre de fato uma forte adsorção do par redox sobre a superfície do ECV, e o eletrodo não lavado, o qual não sofre qualquer tratamento superficial antes das leituras, age como se estivesse modificado.

Esta observação de processo adsorptivo sobre o ECV está em acordo com a sugestão de que os ombros mostrados na Figura 15, pudessem ser devidos a um efeito de adsorção sobre a superfície do eletrodo. Processos adsorptivos podem gerar tal comportamento, ou seja, a geração de um pré-pico e de um pós-pico, adjacentes aos picos correspondentes ao par redox.

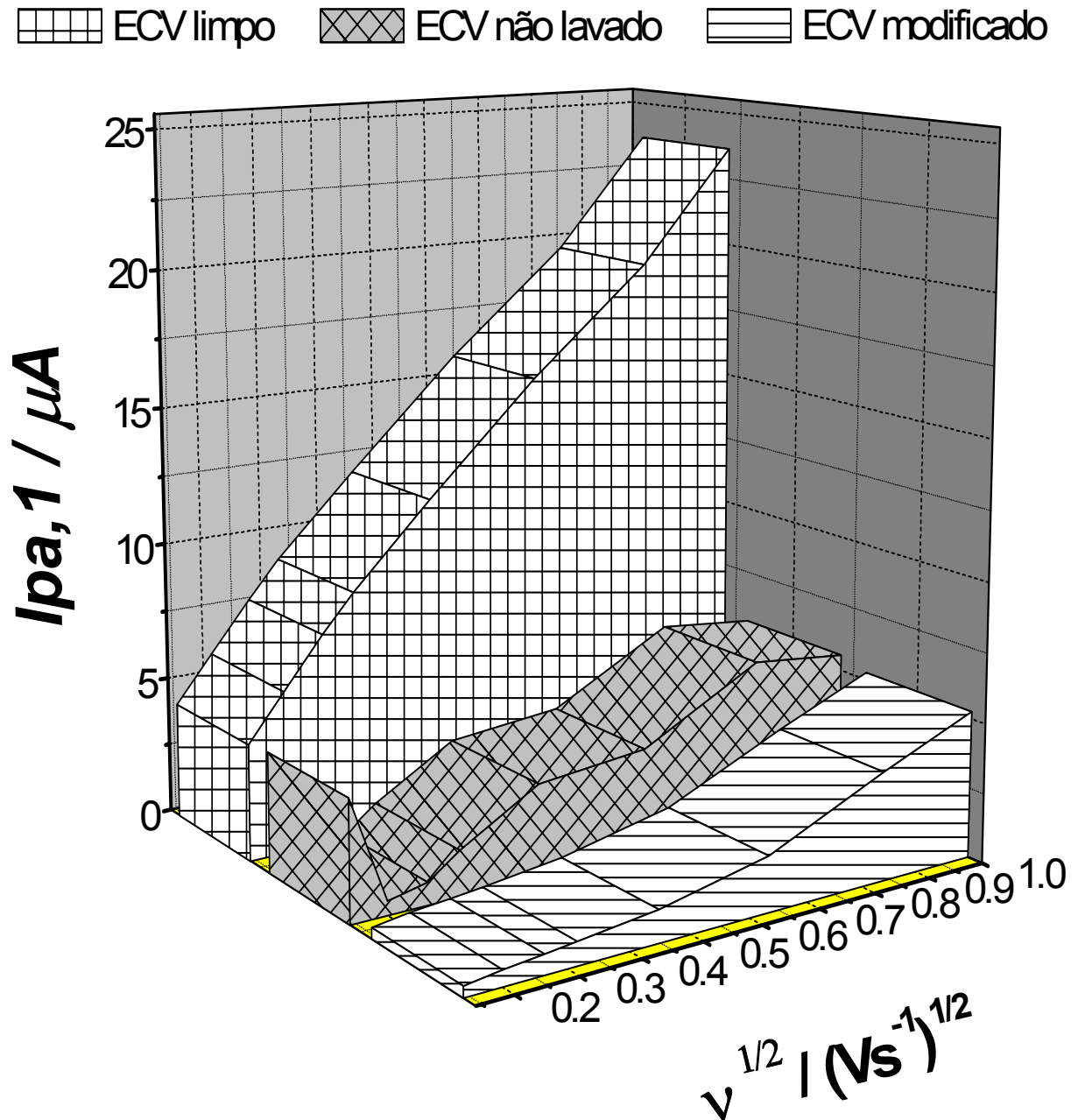


Figura 24: Variação da corrente de pico de oxidação da PQ, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com ECV, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40. ECV limpo: eletrodo polido e lavado antes de cada leitura; ECV não lavado: leituras sucessivas, sem limpeza; ECV modificado: eletrodo submetido a 60 ciclos em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, antes das leituras sucessivas, sem limpeza.

4.1.2. Eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB)

Os resultados obtidos com eletrodo de diamante dopado com boro foram diferentes daqueles apresentados pelo ECV, embora não tenham contribuído com informações novas para a proposição do mecanismo, principalmente pela ausência de picos de adsorção. No caso do estudo do mecanismo, a existência de pares redox, ou de picos que sugerem dependência de um processo anterior, podem ajudar no estabelecimento de etapas intermediárias, ou na sugestão de produtos formados. Como o pico $E_{pc,1}$, no diamante, parece ter caráter irreversível, de imediato não se poderia considerar a hipótese de formação de um par redox conhecido, por exemplo, quinona/hidroquinona. Na Figura 25, vê-se os voltamogramas cíclicos registrados com EDDB, em pH 2,15, branco e terceira varredura. A Figura 26 mostra os voltamogramas cíclicos registrados em pH 7,40.

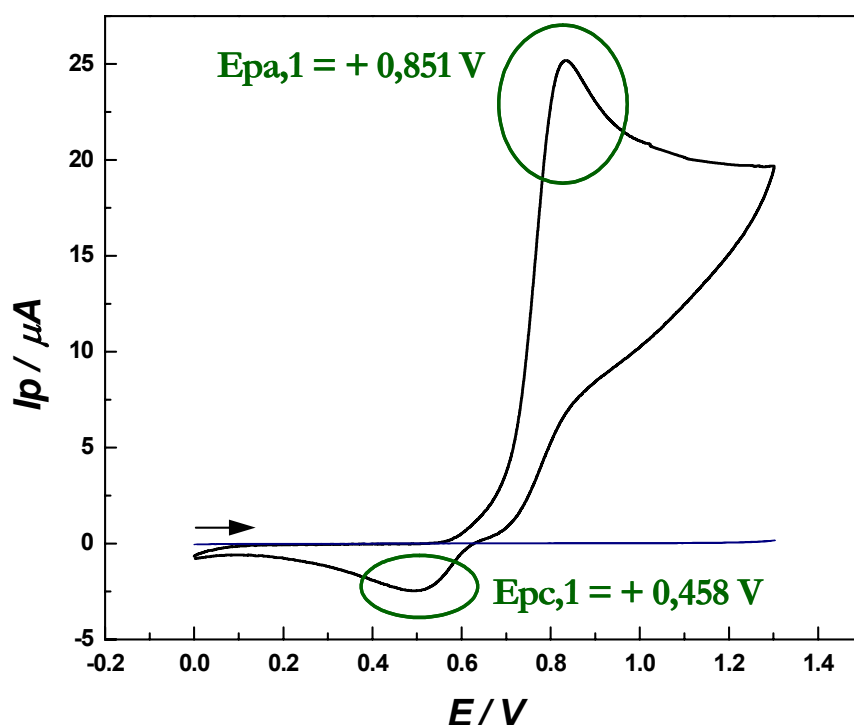


Figura 25: Voltamogramas cíclicos registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. A linha na região de corrente zero refere-se ao branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as varreduras de potencial, e a solução não foi agitada entre as varreduras.

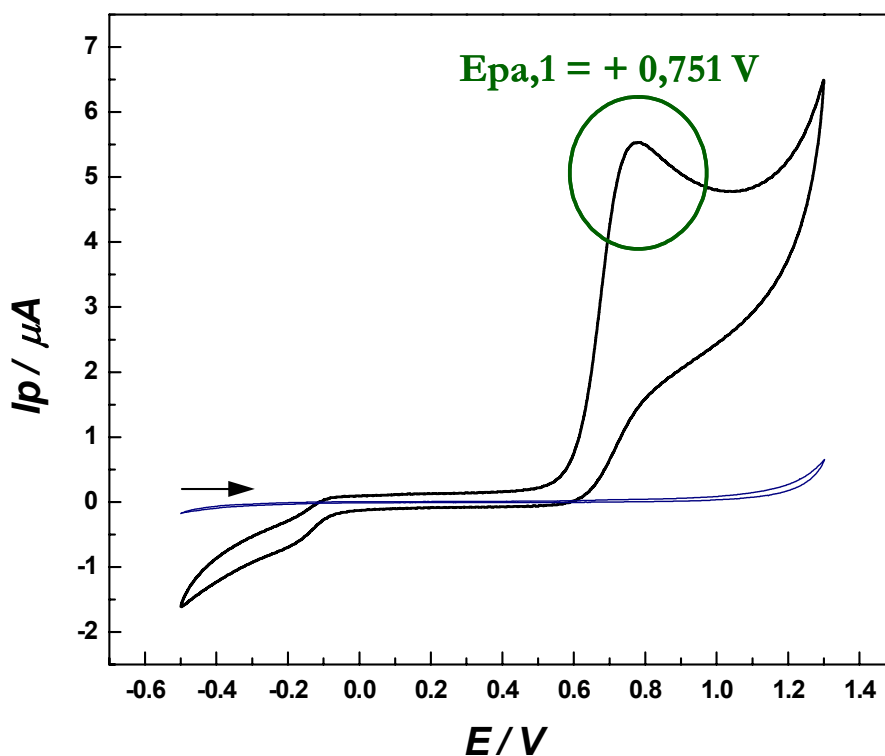


Figura 26: Voltamogramas cíclicos registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ molL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 7,40, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. A linha na região de corrente zero refere-se ao branco. Não houve limpeza do eletrodo entre as leituras, e a solução não foi agitada entre as varreduras.

Como pode ser visto a partir da Figura 26, com a mudança de pH praticamente não se percebe o pico catódico observado em pH 2,15. Pode-se dizer que o par redox não foi detectado, provavelmente devido ao baixo caráter de adsorção superficial do EDDB, porém o processo continua sendo controlado por difusão.

Uma das diferenças entre os resultados obtidos com ECV e EDDB reside no fato de que neste último, o voltamograma registrado na 1ª varredura de potencial é exatamente igual àquele registrado na 3ª varredura, o que mostra que nesta superfície os fenômenos de adsorção são minimizados.

O pico ($E_{pc,1}$) aparece apenas no pH 2,15, sem o correspondente pico anódico ($E_{pa,2}$) e pode se referir a um processo diferenciado daquele observado no ECV, que ainda não foi completamente esclarecido. A linearidade da curva de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura sugere um processo controlado por difusão, Figura 27.

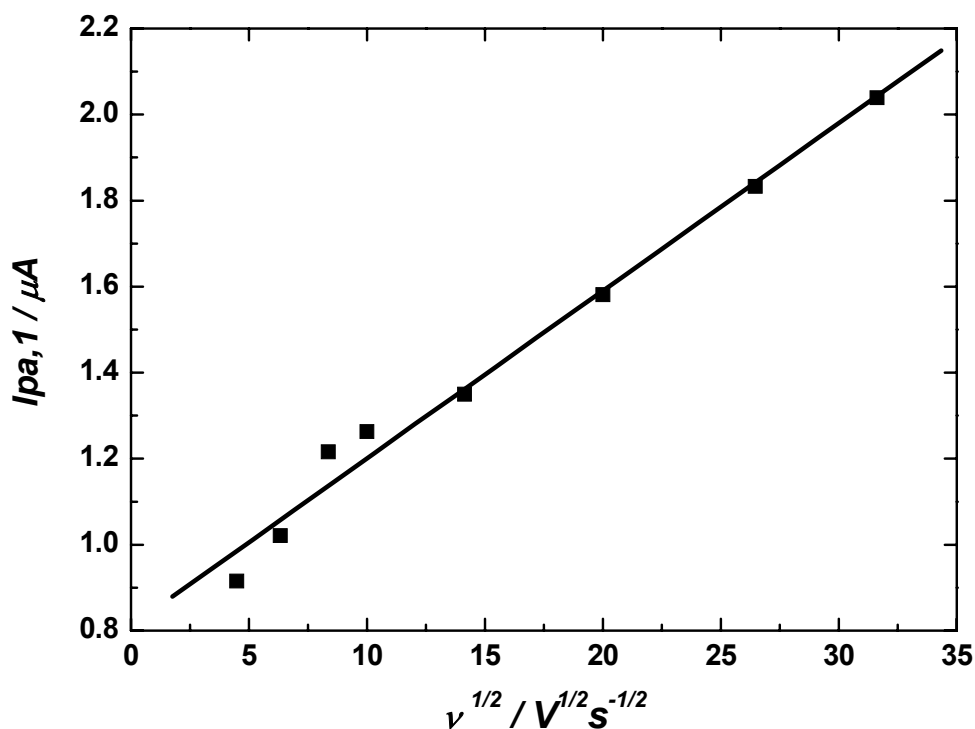


Figura 27: Variação de corrente de pico de oxidação da PQ ($I_{pa,1}$) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15.

Um dado importante observado foi que a relação de função de corrente ($I_p/C \cdot v^{1/2}$) em função de v apresentou queda contínua, sugerindo processo com reação química acoplada, para o pico de oxidação principal da PQ, tanto em pH 2,15 quanto em 7,40, Figura 28, assim como foi observado com o ECV. Esta queda observada para ambos os valores de pH (e ambos os eletrodos), sugere que o equilíbrio ácido/base tem pouca ou nenhuma influência na queda da função de corrente, o que corrobora a hipótese da participação de um cátion radical no processo de oxidação principal da PQ [77].

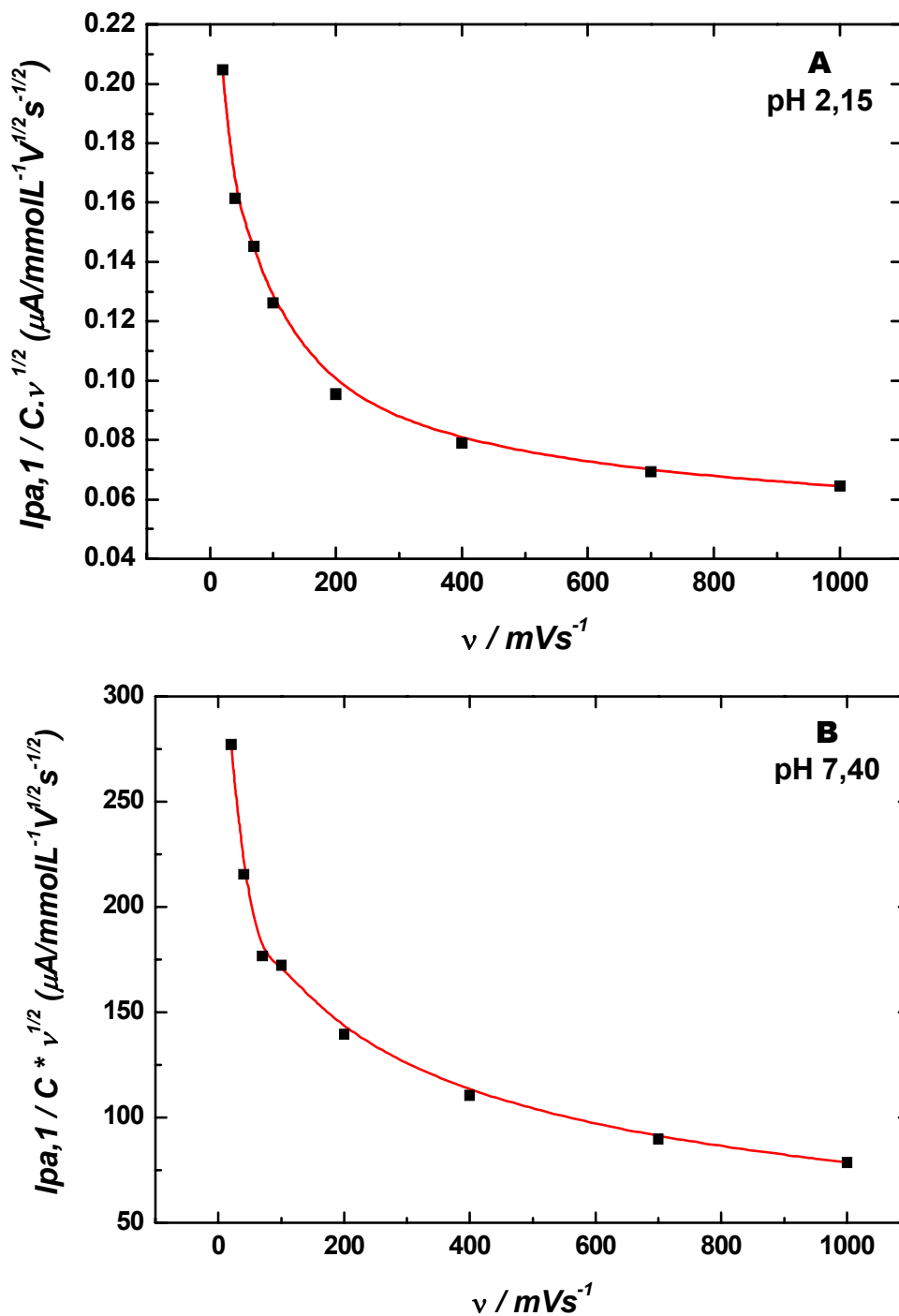


Figura 28: Variação da função de corrente do pico de oxidação, $I_{pa,1}$, em função da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com EDDB, em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15 (**A**) e pH 7,40 (**B**).

Em vista dos resultados obtidos, fica nítido que os voltamogramas cíclicos registrados em EDDB são mais definidos, a corrente de fundo é bem menor e os efeitos de adsorção são minimizados, de modo que potencialidade deste eletrodo pode ser explorada na elaboração de métodos de quantificação de PQ.

4.2. Mecanismo de oxidação eletroquímica da primaquina

O ECV mostrou-se mais adequado para o estudo do provável mecanismo de oxidação da PQ, por imobilizar, em sua superfície, intermediários reativos da oxidação.

Tendo em mãos os dados experimentais discutidos anteriormente, além de dados apresentados na literatura, algumas considerações puderam ser feitas, as quais levaram à proposição de um mecanismo de oxidação eletroquímica da PQ:

- Obteve-se um pico principal de oxidação da PQ (Epa,1), o qual não tem componente catódico;
- Os voltamogramas cíclicos registrados em solução do fármaco representam exemplo clássico de uma oxidação inicial seguida por uma reação química rápida [78];
- Há formação de um par redox dependente do pico Epa,1 e típico de sistemas quinona / hidroquinona, como pode ser visto na Figura 29 [79,80]:

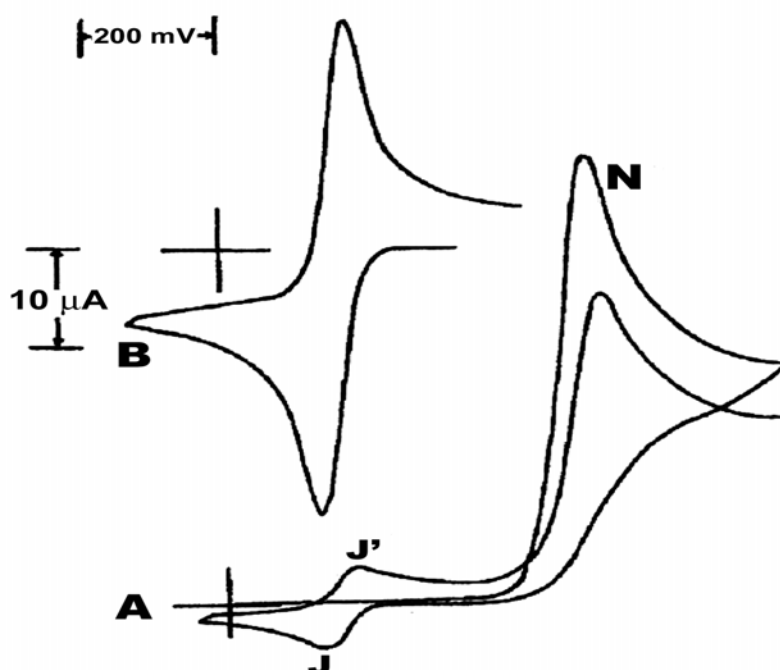


Figura 29: Voltamogramas cíclicos em solução de 1,5-dihidroxi-naftaleno, sobre eletrodo de pasta de carbono, com hidroxilação anódica. **A**: 1,5-dihidroxi-naftaleno em HClO_4 2 M. **B**: 1,4,5-trihidroxi-naftaleno. Sob permissão da American Chemical Society [79].

O par J/J' (+0,157 / +0,207 V) é atribuído à juglona/hidrojuglona.

- O par redox típico de sistemas quinona / hidroquinona, é observado em diversos sistemas, com perfis parecidos, como observado nas Figuras 30 [81] e 31 [82]:

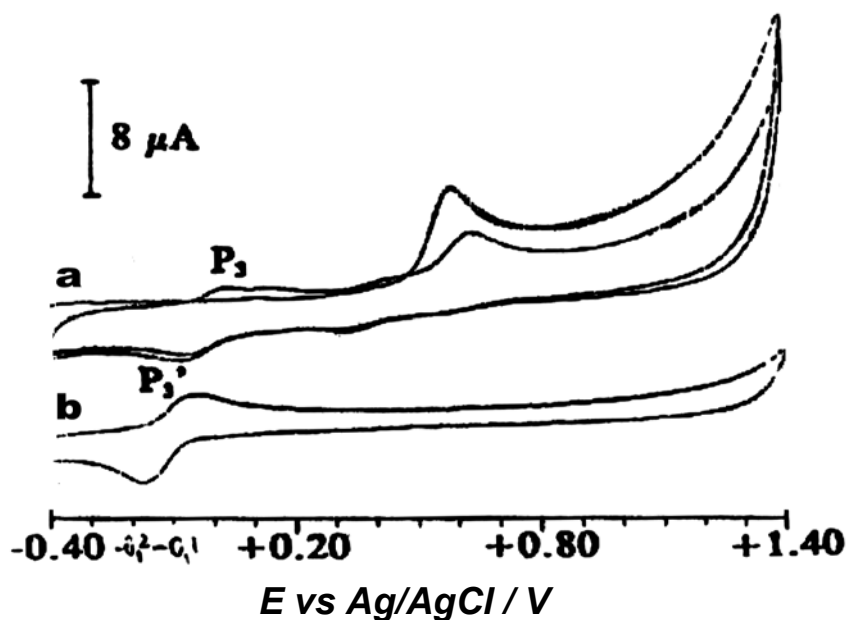


Figura 30: Voltamogramas cíclicos registrados em solução de oxina **(a)** e 1,4-naftoquinona **(b)**. ECV, tampão acetato pH 6, $v = 200 \text{ mVs}^{-1}$. Par redox P_3/P_3' , $\sim -0,17 / -0,05 \text{ V}$. Sob permissão de Wiley VCH Verlag [81].

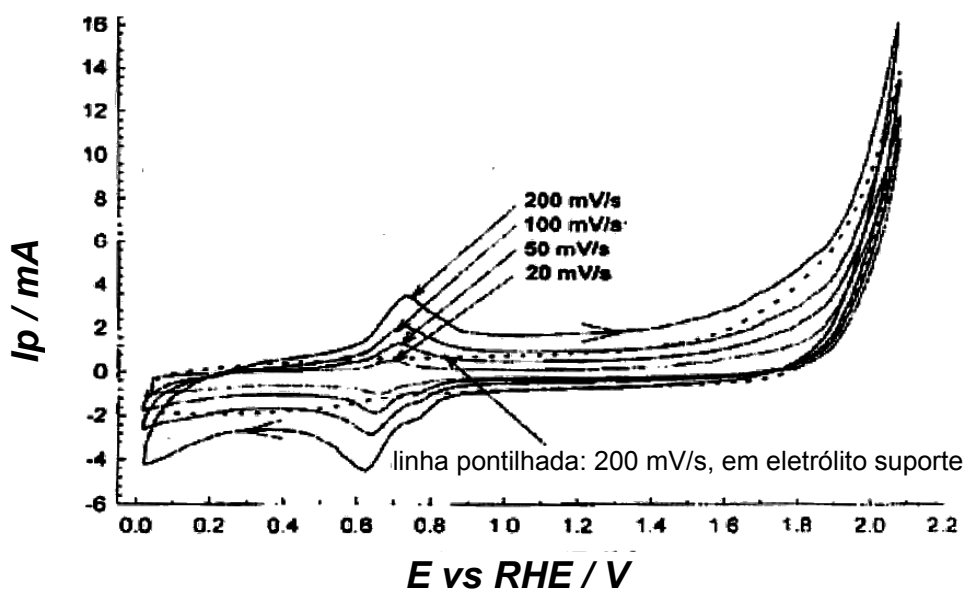


Figura 31: Voltamogramas cíclicos registrados em benzeno. ECV, H_2SO_4 0,5 M, diferentes v . Par redox em $\sim +0,65 / +0,75 \text{ V}$. Sob permissão de Springer (Kluwer) [82].

- Uma vez que a oxidação da PQ gera um par redox adicional, característico do par quinona/hidroquinona (Figura 15), pode-se admitir que a molécula de PQ deve obrigatoriamente sofrer uma hidroxilação, que justifique então o aparecimento do sistema quinona / hidroquinona. Isto pode acontecer através de uma etapa inicial eletroquímica com a formação de um cátion radical, com posterior hidroxilação da molécula, numa etapa química. Este processo pode ser representado como na Figura 32 [83]:

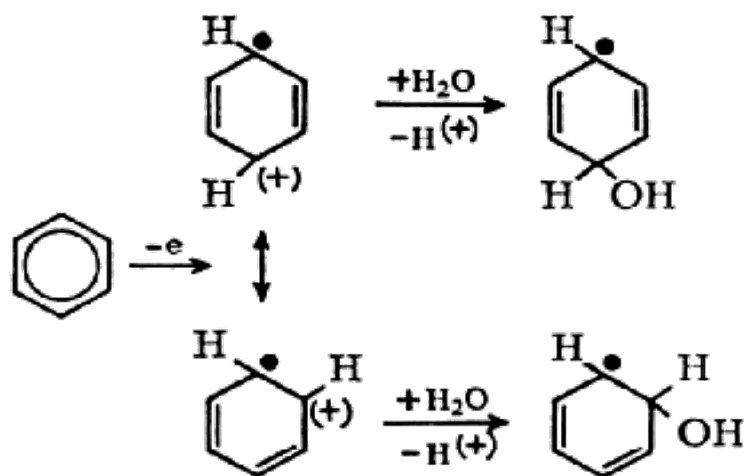
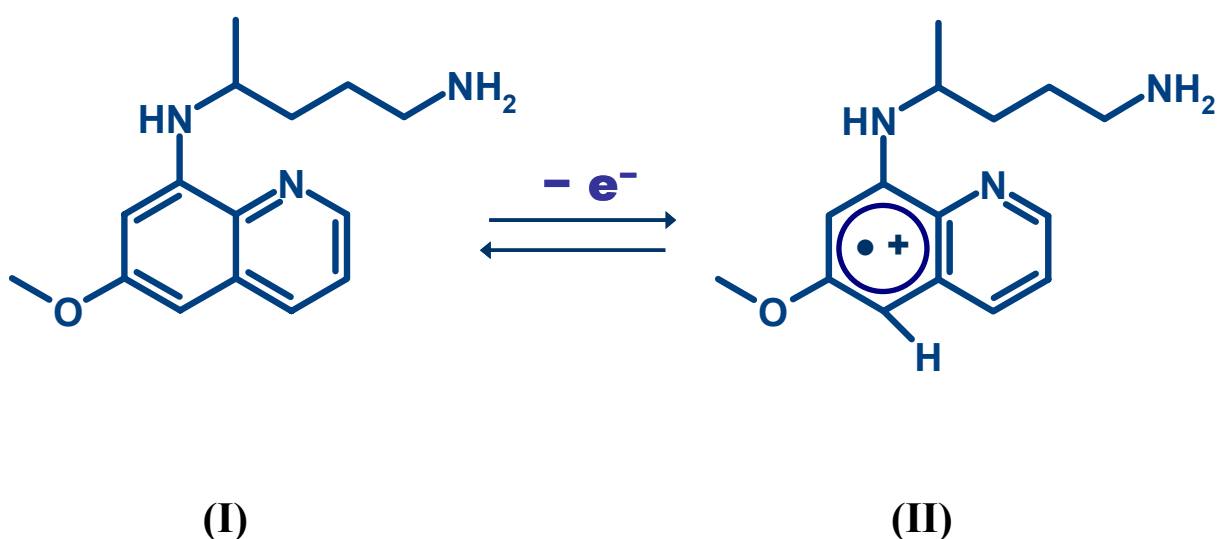


Figura 32: Esquema de oxidação de benzeno, com formação de cátion radical, com perda de 1 elétron, e posterior captura nucleofílica do cátion, por água, para gerar um composto hidroxilado. Sob permissão de Wiley VCH Verlag [83].

Portanto, com o conjunto destes resultados e considerando-se todos os dados disponíveis na literatura, chegou-se à proposição do mecanismo a seguir, baseado em todos os dados coletados com o ECV. Some-se a estes resultados com o ECV, a observação experimental também efetuada com o EDDB, de que a variação da função de corrente em função da velocidade de varredura tem caráter decrescente, indicando uma reação química acoplada à reação eletroquímica, que não necessariamente um equilíbrio ácido-base.

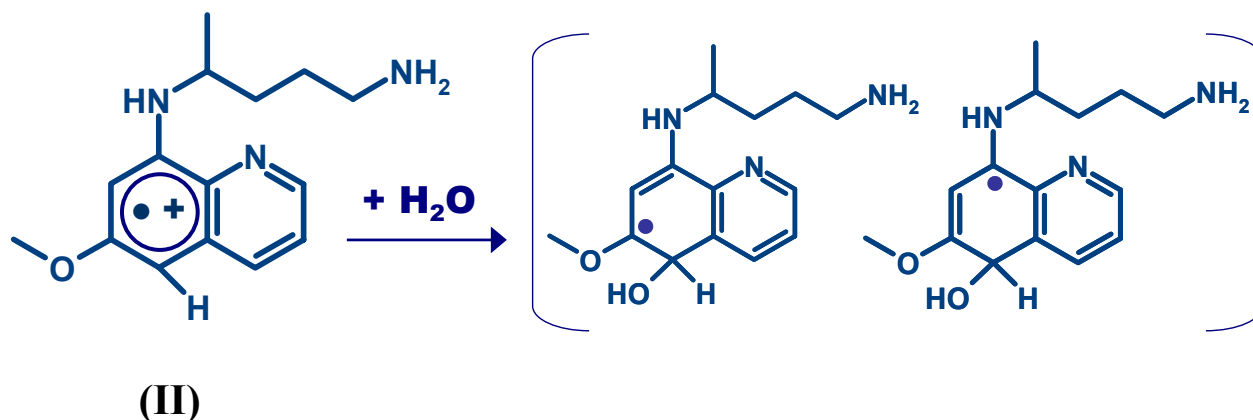
Num primeiro estágio, considerando que deve ocorrer a hidroxilação da molécula de PQ, já que o par redox observado após a oxidação principal do fármaco (Figura 15) tem perfil de composto quinoidal/hidroquinoidal e na molécula de PQ não existe um grupo com esta característica, há necessariamente a disponibilização da posição 5 da molécula de acordo com os processos orgânicos conhecidos, a formação de um cátion radical [83-86], numa etapa eletroquímica, representada pelo pico principal de oxidação da PQ, Epa,1, envolvendo a perda de 1 elétron. Este tipo de oxidação anódica acontece facilmente em moléculas orgânicas que possuam elétrons π , ou que tenham heteroátomos em sua estrutura, como o oxigênio, que é o caso da PQ (grupo metóxi na posição 6) [87,88].



Esquema 2: Oxidação eletroquímica da PQ, originando um cátion radical.

A deslocalização do elétron desemparelhado em sistemas conjugados estabiliza os radicais, e a possibilidade de sua deslocalização, como no caso da PQ, facilita a ocorrência da oxidação anódica [77].

Em seguida, ocorre a reação do cátion radical, um eletrófilo poderoso, com um nucleófilo (OH^-) com hidroxilação da posição 5 da molécula de PQ e formação dos respectivos híbridos de ressonância:



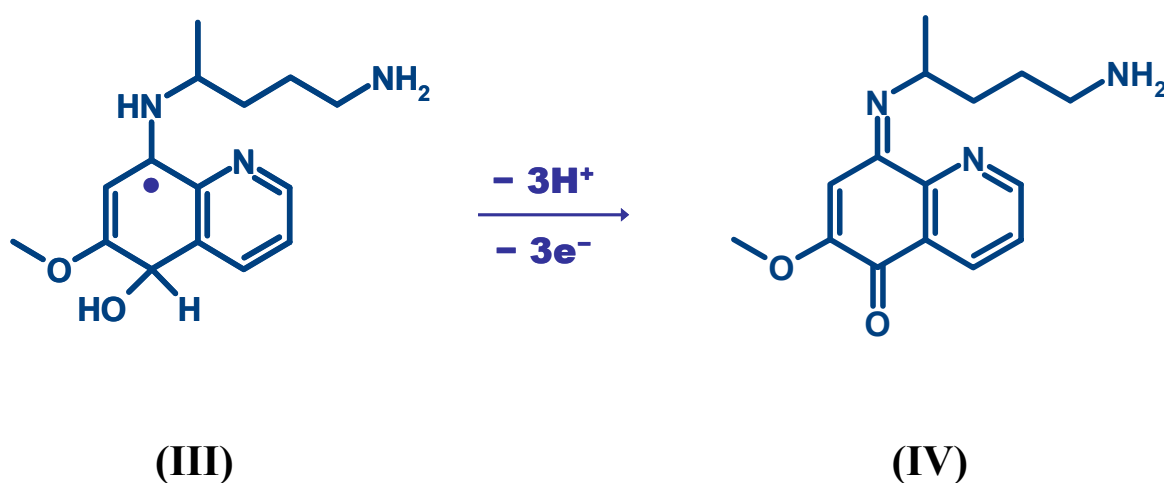
Esquema 3: Captura nucleofílica do cátion radical, com consequente hidroxilação da molécula de PQ e formação dos híbridos de ressonância.

A hidroxilação não acontece diretamente via ataque nucleofílico à molécula de PQ, sem a etapa de oxidação [79,80], pois seria preciso que houvesse algum grupo aceptor de elétrons na molécula, que originasse uma carga parcial positiva no anel, facilitando a entrada do nucleófilo. Pelo contrário, no anel quinolínico da PQ há 2 grupos doadores de elétrons, $\text{H}_3\text{CO}-$ e $-\text{N}-\text{HR}$. Assim, a hidroxilação da posição 5 da molécula passa pela etapa inicial de oxidação direta do anel, já que os grupos doadores de elétrons conferem a ele caráter redutor.

Considerando que os resultados sugerem a ocorrência de uma reação química após a etapa eletroquímica, o potencial de oxidação da PQ ($E_{pa,1} = + 0,788 \text{ V}$, pH 7,40) deveria se deslocar para valores menos positivos, com o aumento de v . Mas observou-se o contrário, $E_{pa,1}$ variou para valores mais positivos com o aumento de v . Isto pode indicar que a reação química acoplada seria lenta e portanto, um aumento de v desfavoreceria a ocorrência do processo, justificando a variação de $E_{pa,1}$ para valores mais positivos de potencial, com o aumento de v .

A oxidação ocorre na posição 5 do anel, confirmando a formação de 5-HPQ numa etapa inicial, já que os grupos doadores de elétrons são *o*-/*p*- direcionadores. A tendência seria que a hidroxilação ocorresse na posição 7, mais próxima ao grupo —NHR, direcionador mais forte que o H₃CO—, pois teria mais probabilidade de atrair a carga positiva gerada pela oxidação inicial. Isto provavelmente não ocorre por 2 motivos: impedimento estérico, já que a posição 7 está localizada entre os 2 grupos substituintes, e o grupo —NHR é razoavelmente grande; e a posição 5 também é favorável, já que é *orto* em relação ao grupo H₃CO— e *para* em relação ao —NHR, mantendo-se assim os direcionamentos preferenciais dos grupos citados.

Como pode ser visto no mecanismo, o anel quinolínico fica com um elétron deslocalizado, dando origem aos híbridos de ressonância [89]. Esta etapa química é imediatamente seguida por outra eletroquímica, que seria a oxidação imediata do grupo hidroxila à respectiva quinona, sob o potencial aplicado, como pode ser visto no Esquema 4.



Esquema 4: 2ª etapa eletroquímica de oxidação da PQ, com formação de um composto quinonaimínico.

A posição 8 também sofre oxidação, com formação de uma imina, =NR, já que aminas aromáticas são facilmente oxidadas em potenciais anódicos semelhantes aos observados, variando de +0,4 a +1,0 V (SCE) [90]. A variação nos potenciais de pico com o pH sugere de fato o envolvimento de prótons na reação de transferência de carga.

Experimentos realizados em solução de 5-HPQ corroboram esta proposição, pois voltamogramas cíclicos registrados em janela reduzida, com E_{λ} anterior à posição de potencial referente ao pico principal da PQ, $E_{pa,1}$, apresentam par redox semelhante àquele observado em voltamogramas registrados em solução de PQ. A Figura 33 mostra os voltamogramas comparativos entre os dois compostos, bem como voltamograma registrado em solução de naftoquinona, composto que também gera par redox quinoidal/hidroquinoidal [82].

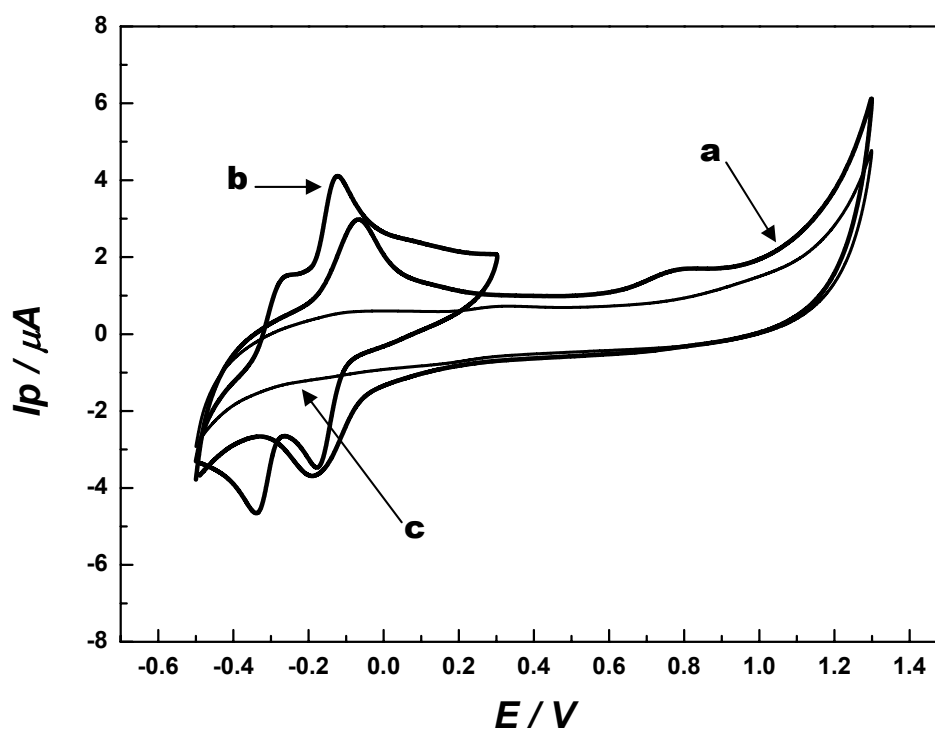
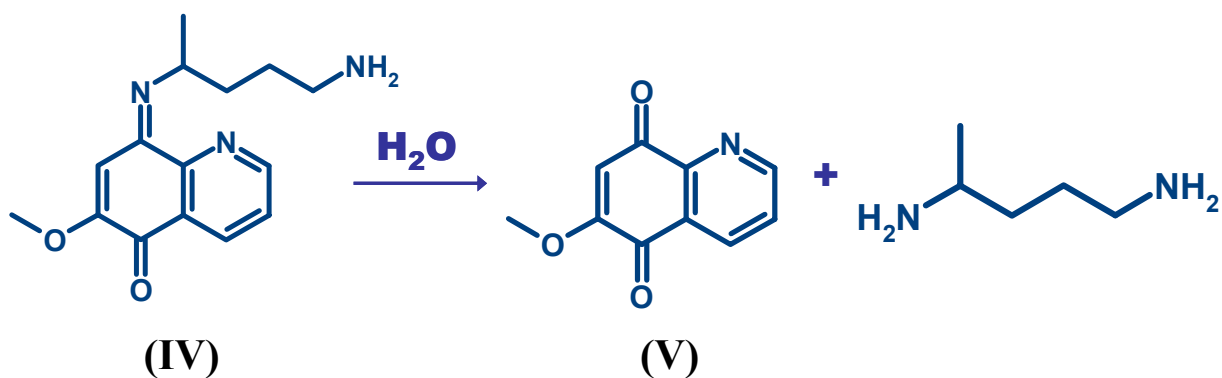


Figura 33: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, 60ª varredura; (a) e 5-HPQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, 3ª varredura; (b), em solução tampão BR (c), pH 7,40.

Como pode ser observado na figura, o VC obtido em solução de 5-HPQ apresenta 2 pares redox. Em ambos os casos, ΔE_P estão próximos de 59 mV, indicando que ocorre a oxidação da 5-HPQ à respectiva quinona, após formação do radical fenoxil, como intermediário

ativo. Deve-se ressaltar também que no intervalo de potencial usado, $-0,6$ a $+1,2$ V, não houve oxidação da 5-HPQ ao respectivo cátion radical, como no caso da PQ, pois não se observou qualquer pico de oxidação nesta janela de potencial.

Como os experimentos foram realizados em meio aquoso, a imina (IV) imediatamente sofre hidrólise, formando o derivado quinoidal no anel quinolínico, produzindo uma diamina primária, o que significa outra reação química posterior ao processo eletroquímico. A 1,4-pentanodiamina formada não interfere nos resultados voltamétricos, porque aminas alifáticas primárias são mais difíceis de se oxidar do que as secundárias ou terciárias, e somente se oxidam em potenciais que variam entre $+1,6$ e $+1,7$ V (SCE) [89,90]. Todo este mecanismo restante envolvido na oxidação da PQ é representado no Esquema 5:



Esquema 5: Hidrólise da imina, com formação do respectivo derivado quinoidal e de 1,4-pentanodiamina.

Para que ocorra o ataque nucleofílico ao cátion radical, e a hidrólise da imina formada, é fundamental a presença de água no meio. Elucidando esta questão, trabalhou-se em meio aprótico, na presença de DMF. Neste caso, os voltamogramas cíclicos apresentaram 2 picos anódicos envolvidos, na região do pico principal da PQ, com um pico catódico (Epc,2) correspondente ao pico principal de oxidação da PQ (Epa,1) cuja intensidade de corrente aumenta com a velocidade de varredura, como pode ser visto na Figura 34. Com a diminuição do teor de água no meio, o processo passou a ser quasi-reversível, em relação ao pico principal

da PQ, comportamento típico de um processo eletroquímico seguido de uma reação química acoplada, em que a água atua como reagente. O pico catódico, $E_{pc,2}$, ausente em meio aquoso, pode relacionar-se ou à redução do cátion radical (II) inicialmente formado, ou à redução do composto quinonaimínico (IV). Conseqüentemente, somente ocorre a formação do derivado quinoidal (pela hidrólise da imina) em muito menor quantidade, pois a ausência de água na DMF não é de 100%, de modo que o par redox quinoidal/hidroquinoidal derivado da PQ apresenta intensidades de correntes inferiores àquelas registradas em meio aquoso.

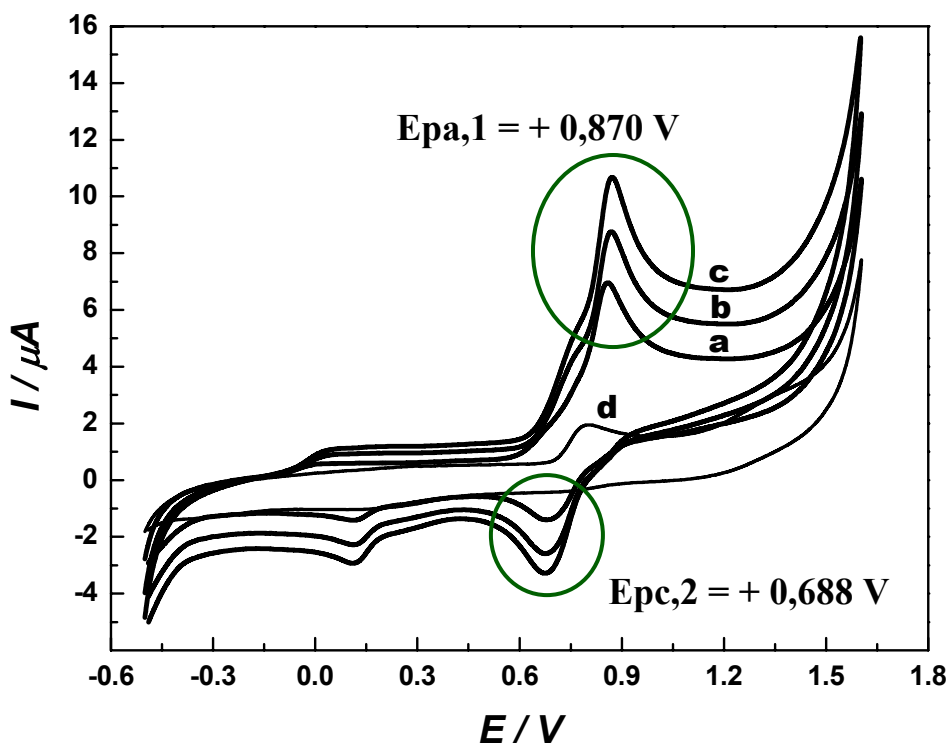
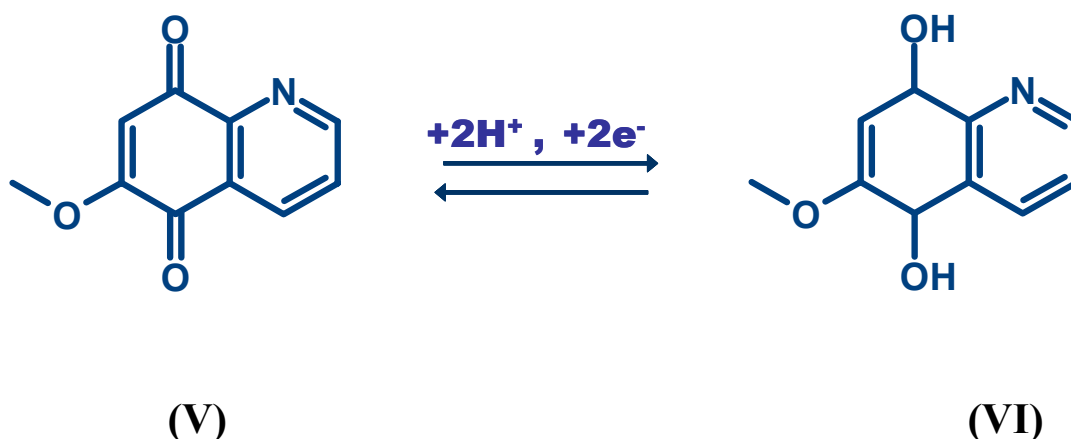


Figura 34: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em DMF, com TBATFB/ $0,2 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte. Velocidades de varredura: (a) 40 mVs^{-1} , (b) 80 mVs^{-1} , e (c) 100 mVs^{-1} . (d): branco. Eletrodo limpo entre as varreduras.

Em seguida, o derivado quinoidal, formado de acordo com Esquema 5, se reduz no sentido inverso da varredura, em $E_{pc,2}$, formando o derivado hidroquinoidal da PQ, o qual se oxida em $E_{pa,2}$, na 2ª varredura, estabelecendo-se assim o par redox do derivado quinoidal/hidroquinoidal da PQ, Esquema 6.



Esquema 6: Formação do par redox do derivado quinoidal/hidroquinoidal da PQ.

Adicionalmente, apenas a título de comparação, voltamogramas cíclicos registrados em solução de *m*-anisidina (Figura 35), composto com os mesmos substituintes que a PQ, forneceram resultados qualitativamente parecidos àqueles obtidos em solução de PQ, em termos da ocorrência de picos de oxidação e redução em varreduras sucessivas, para soluções de mesmos valores de pH. Como a molécula de *m*-anisidina também possui um grupo metóxi e um grupo amina, a hipótese é que o mesmo mecanismo se aplique a este caso. A característica dos voltamogramas da *m*-anisidina é semelhante a dados obtidos anteriormente com a *o*-anisidina [86,91], embora os autores não tenham realizado várias varreduras, o que confirmaria também a presença do par redox observado por nós. O potencial de pico observado ($\sim 0,590$ V) está em acordo com o valor teórico apresentado por Weinberg e Weinberg [92]. A Figura 36 mostra os voltamogramas registrados em solução de *m*-anisidina, em comparação com os de PQ, nos dois valores de pH estudados, 2,15 e 7,40.

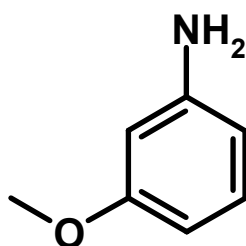


Figura 35: Estrutura da molécula de *m*-anisidina.

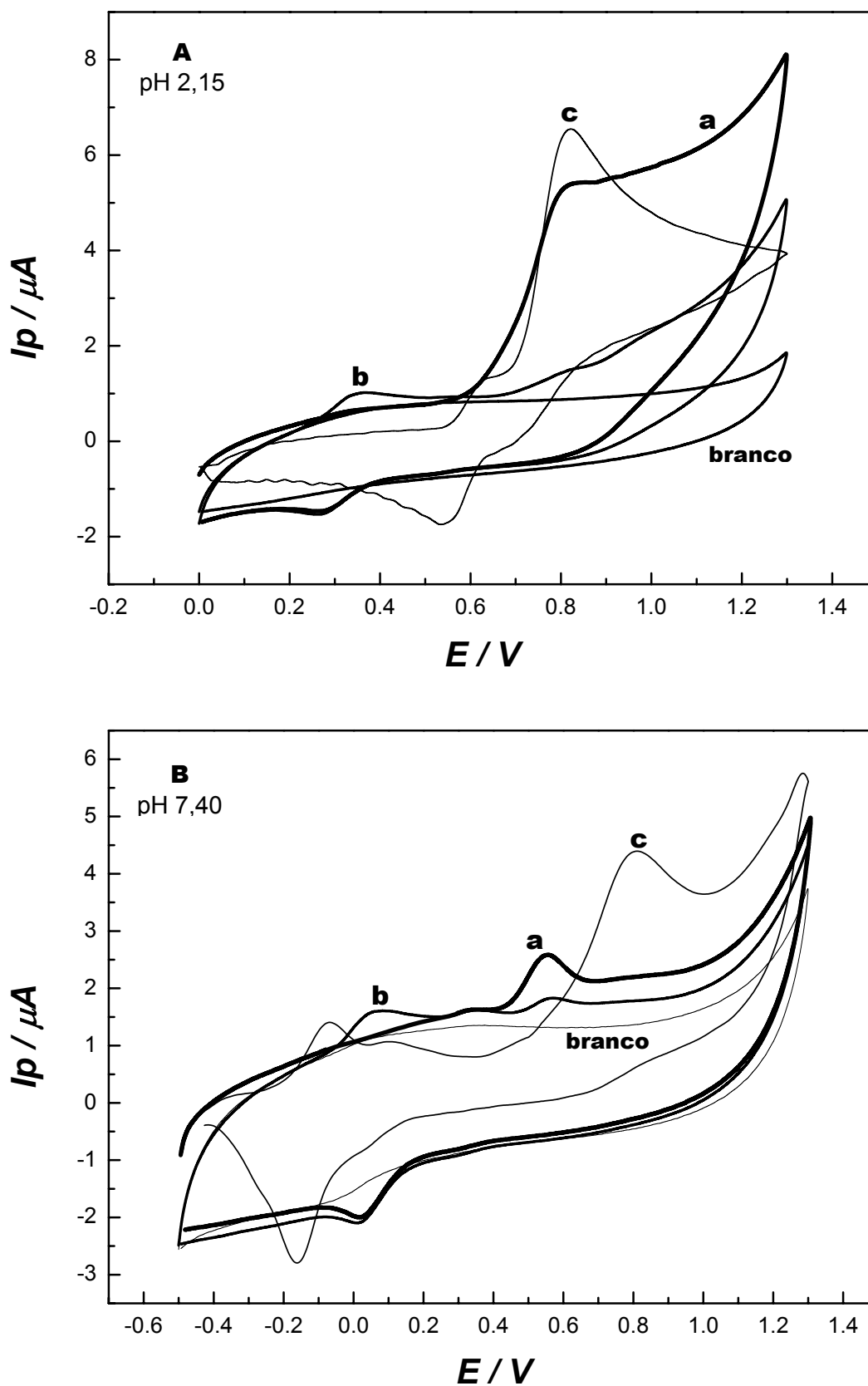
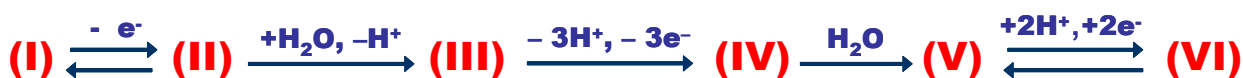


Figura 36: Voltamogramas cíclicos registrados com ECV, solução de *m*-anisidina $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, e PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão BR. pH 2,15 (A), pH 7,40 (B). 1^a varredura (a), 3^a varredura (b), e PQ (c), 3^a varredura.

Uma outra hipótese a ser considerada seria a dimerização da molécula de PQ, na posição 8. Obteria-se então o correspondente azocomposto, com uma dupla ligação entre os átomos de nitrogênio da posição 8. Neste caso, o dímero formado na solução teria um tipo de atividade no eletrodo que poderia produzir múltiplas curvas numa varredura de voltametria cíclica [76]. Observou-se esta multiplicidade de curvas em alguns experimentos com a PQ, mas isto pode estar simplesmente relacionado com os diferentes processos eletroquímicos citados anteriormente, e não unicamente com uma possível dimerização. Por outro lado, considera-se improvável a dimerização, pois a molécula de PQ é muito grande, o que dificultaria a reação, já que existe a cadeia alifática lateral ao nitrogênio ligado ao anel aromático. Além destas hipóteses, a oxidação de compostos aromáticos leva à formação de dímeros somente em meio de baixa nucleofilicidade, que não é o nosso caso [93].

Portanto, o mecanismo geral proposto é:



Ou seja, um mecanismo ECEC, sigla em inglês para “electrochemical-chemical-electrochemical-chemical”, um processo inicial eletroquímico, e na seqüência químico, eletroquímico e químico. O perfil obtido para a variação da função de corrente em função de v , para ambos os valores de pH estudados (2,15 e 7,40), e ambos os eletrodos (ECV e EDDB), corrobora a existência de um processo eletroquímico com reação química acoplada (mecanismo ECE [76]).

Com o objetivo de obter resultados que dessem suporte experimental ao mecanismo proposto, procurou-se determinar o número de elétrons envolvidos no processo principal de oxidação da PQ, registrado em Epa,1. Inicialmente, determinou-se o coeficiente de difusão (D) da PQ, como descrito no item “Parte experimental”. Os valores calculados, através do método de Wilke-Chang [73], foram D_{PQ} : $5,37 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (em meio aquoso) e

D_{PQ} : $1,60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (em DMF). Estes valores foram utilizados nas equações 2 a 4, de acordo com o método empregado. A área do eletrodo de diamante dopado também foi previamente determinada experimentalmente, conforme item 3.3.6., sendo da ordem de $0,053 \text{ cm}^2$.

Foram realizados experimentos cronoamperométricos, especificamente para o cálculo do número de elétrons, e o valor encontrado foi comparado com os dados obtidos experimentalmente usando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

A Figura 37 mostra a variação da razão de correntes $I_{d,t}/I_{d,ss}$ em função de $t^{-1/2}$, dados obtidos cronoamperometricamente, a partir de medidas feitas em solução de PQ $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em tampão BR, pH 7,40, com microeletrodo de carbono vítreo (μECV). Concentrações da ordem de 10 mmolL^{-1} foram empregadas para evitar a grande influência da corrente capacitiva [94]. Os experimentos realizados em concentrações $\leq 5 \text{ mmolL}^{-1}$ não forneceram dados que pudessem ser utilizados.

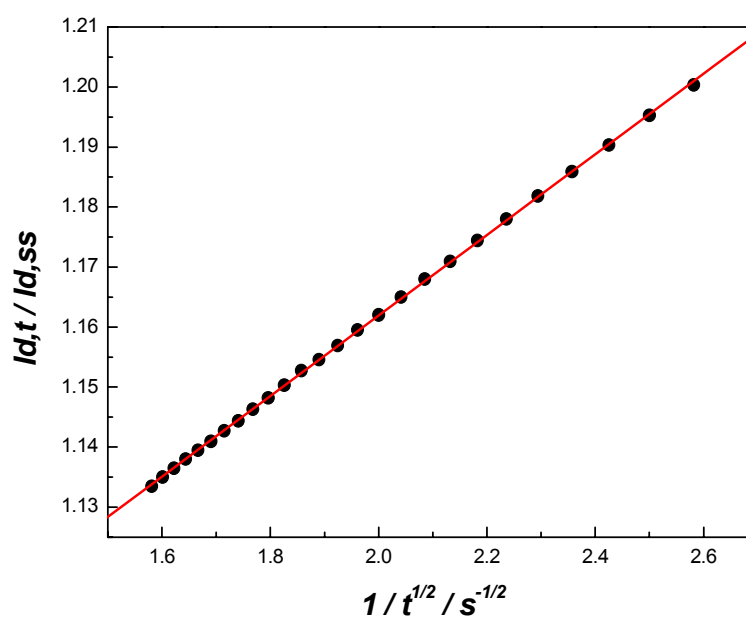


Figura 37: Variação da razão $I_{d,t}/I_{d,ss}$ em função de $t^{-1/2}$. Dados obtidos com μECV (área $9,50 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$), em solução de PQ $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução tampão BR, pH 7,40. Número de pulsos de potencial: 2; nível 1: potencial 0 V, duração 2 s, tempo de amostragem 0,01 s; nível 2: potencial 0,62 V, duração 5 s, tempo de amostragem 0,01 s. $I_{d,t}/I_{d,ss} = (1,03 \pm 3,2 \times 10^{-4}) + (0,067 \pm 1,6 \times 10^{-4})t^{-1/2} (\text{s}^{-1/2})$. $R = 0,9999$; $P < 0,0001$.

De acordo com a equação 3, o número de elétrons obtido foi **1 elétron**, para o pico principal de oxidação da PQ.

Os voltamogramas de VPD obtidos com ECV não permitem o cálculo correto de **n**, pois se apresentam convoluídos e há claramente um efeito adsorptivo observado em potenciais mais negativos, como se pode perceber pela Figura 38.

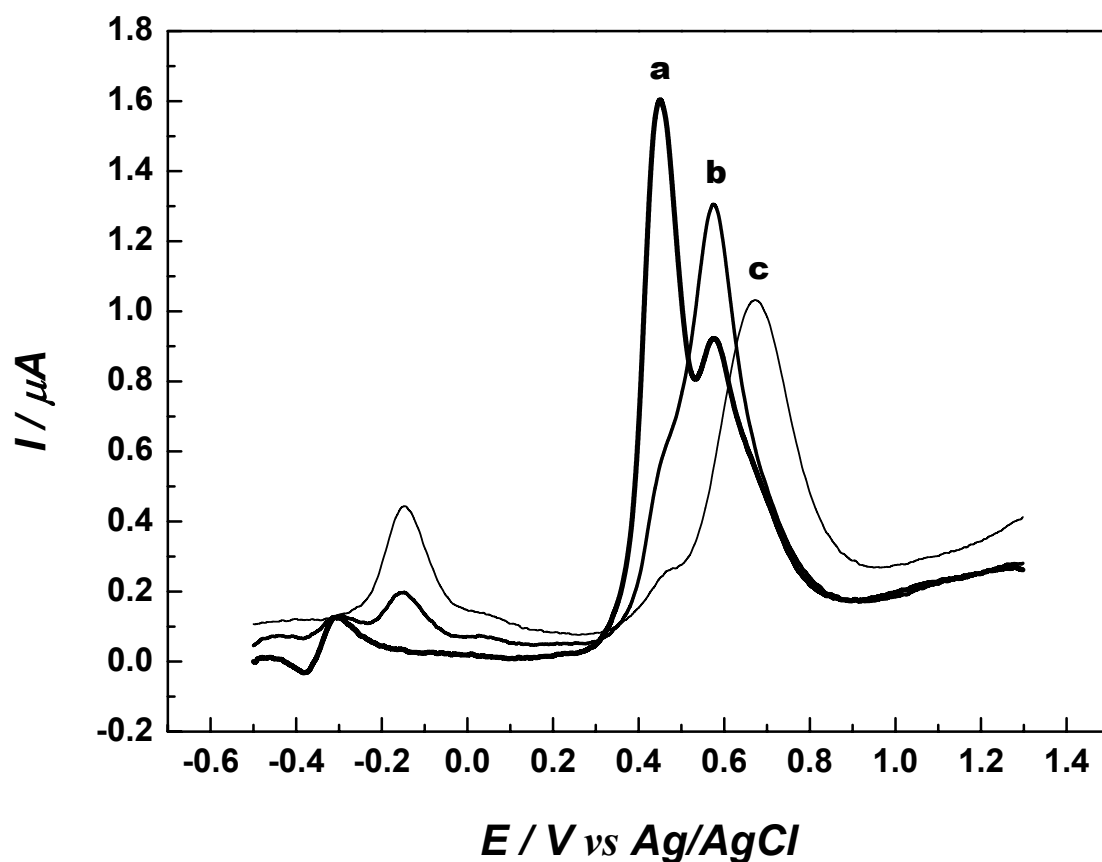


Figura 38: Voltamogramas de pulso diferencial, registrados com ECV, solução de pH 7,40, PQ 0,01 mmolL⁻¹, $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$; 1^a varredura (a), 2^a varredura (b), e 6^a varredura (c). Condições experimentais: amplitude de pulso: 0,06 V; intervalo de pulso: 1 s; tempo de equilíbrio: 25 s; $E_i = + 0,4 \text{ V}$; $E_f = + 1,0 \text{ V}$.

Na Figura 39 vê-se os voltamogramas de VPD registrados com eletrodo de diamante, 1^a e 3^a varreduras, sendo que as demais varreduras de potencial são praticamente iguais.

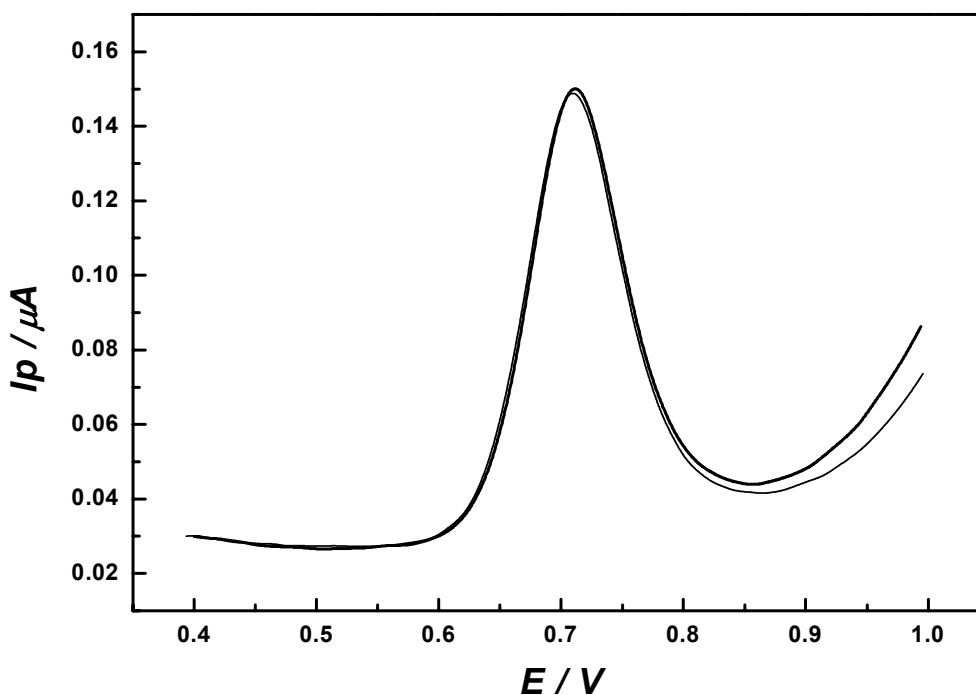


Figura 39: Voltamogramas de pulso diferencial, registrados com EDDB, solução de pH 7,40, PQ 0,01 mmolL⁻¹, $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$; 1ª e 3ª varreduras. Condições experimentais: amplitude de pulso: 0,06 V; intervalo de pulso: 1 s; tempo de equilíbrio: 25 s; $E_i = +0,4 \text{ V}$; $E_f = +1,0 \text{ V}$.

O valor obtido para $W_{1/2}$ foi de 0,091 e, quando substituído na Equação 4, pág. 70, forneceu n igual a 1, para o pico de oxidação principal da PQ.

Utilizou-se os dados obtidos dos voltamogramas cíclicos, registrados em solução de pH 2,15, meio aquoso com ECV, e também os dados em DMF com μ ECV, para a determinação do número de elétrons envolvido do processo de oxidação da PQ.

Embora a equação de Randles-Ševičk não seja recomendada para o cálculo do número de elétrons em processos onde existam etapas químicas acopladas, a sua utilização poderá fornecer pelo menos um valor aproximado de n . Neste caso, n também foi igual a **1 elétron**. Os coeficientes angulares das equações de reta apresentadas nas Figuras 40 e 41 foram substituídos na Equação 2, pág. 70.

Este dado, $n = 1$, obtido por 3 técnicas diferentes, está de acordo com o fato de que, no caso de haver uma oxidação anódica com posterior hidroxilação, a transferência de carga é a etapa limitante da reação [77,87].

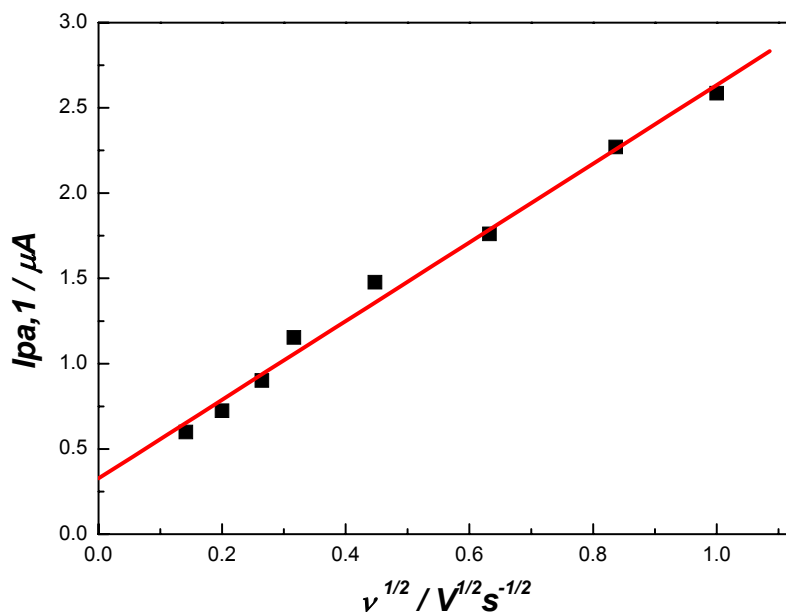


Figura 40: Variação da corrente de pico principal da PQ, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos dos voltamogramas registrados com ECV (área $3,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$), em solução de PQ $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em solução de tampão BR pH 2,15. Valor de D_{PQ} : $5,37 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Equação de reta: $I_{pa,1} = (5,47 \times 10^{-6} \pm 1,23 \times 10^{-6}) + (5,67 \times 10^{-5} \pm 2,18 \times 10^{-6}) v^{1/2}$. $R = 0,9957$; $P < 0,0001$. Eletrodo limpo entre as varreduras.

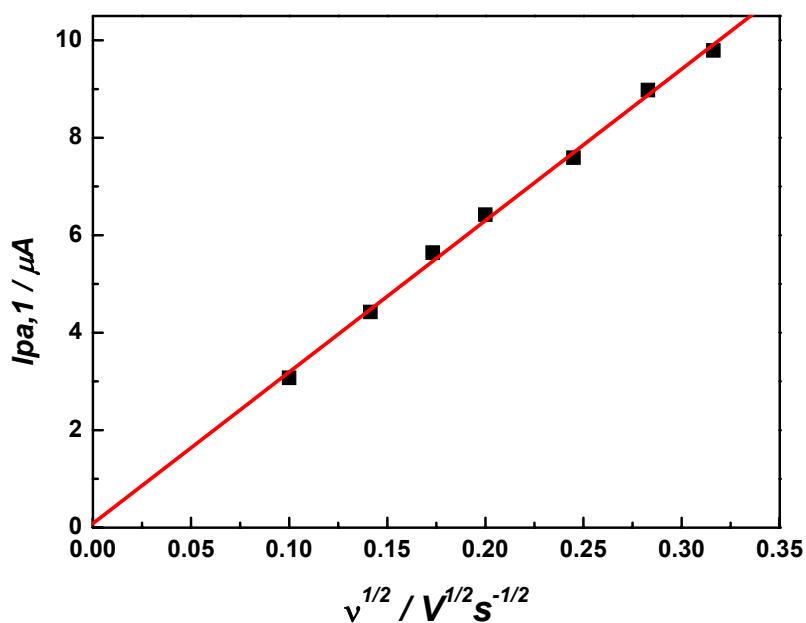


Figura 41: Variação da corrente de pico principal da PQ, $I_{pa,1}$, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos dos voltamogramas registrados com μ ECV, em solução de PQ $0,05 \text{ mmolL}^{-1}$, em meio aprótico de DMF / TBATFB. Valor de D_{PQ} : $1,60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Equação de reta: $I_{pa,1} = (8,35 \times 10^{-8} \pm 1,63 \times 10^{-7}) + (3,11 \times 10^{-5} \pm 7,40 \times 10^{-7}) v^{1/2}$. $R = 0,9998$; $P < 0,0001$. Eletrodo limpo entre as varreduras.

4.3. Determinação analítica de primaquina com eletrodo de diamante dopado com boro

As mesmas espécies ativas formadas via metabólitos da PQ (radicais livres ou espécies ativas de oxigênio), que atuam diretamente sobre o parasito, podem desencadear também estresse oxidativo nas células humanas, causando anemia hemolítica ou metemoglobinemia, efeitos colaterais associados à utilização de PQ. Portanto, torna-se fundamental o controle de dosagem deste fármaco em fluidos biológicos. Vários métodos têm sido usados com este intuito, como eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta performance, colorimetria, voltametria, uso de eletrodo seletivo [95-101]. O método oficial aceito é a cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica, em meio de ácido clorídrico [8].

Com o objetivo de propor uma alternativa barata, rápida e eficiente para determinação deste fármaco, desenvolveu-se um método eletroanalítico, utilizando-se como eletrodo de trabalho filmes de diamante dopado com boro (EDDB), em função de suas características já discutidas anteriormente [42,44]. Para efeito de comparação utilizou-se também o eletrodo de carbono vítreo (ECV). Trabalhou-se com a voltametria de pulso diferencial (VPD) pois foi a técnica voltamétrica que melhor se adaptou ao processo de oxidação eletroquímica da PQ, que envolve reações lentas que dificilmente são percebidas por voltametria de onda quadrada, por exemplo. Otimizou-se as condições experimentais, visando a obtenção de baixos limites de detecção, boa precisão e exatidão, além de rapidez analítica.

Como salientado anteriormente, o EDDB não se mostrou adequado para as medidas experimentais quando o objetivo era estudar o possível mecanismo de eletrooxidação da PQ, uma vez que os efeitos de adsorção de intermediários reativos não foram observados. Assim, esta superfície foi agora empregada para fins analíticos.

A Figura 42 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB em solução de PQ, e a Figura 43, os voltamogramas registrados com o ECV. A agitação da solução entre o registro de um voltamograma e outro foi suficiente para a renovação da superfície do filme de diamante e assegurou a obtenção de medidas reproduzíveis, sem efeitos de adsorção.

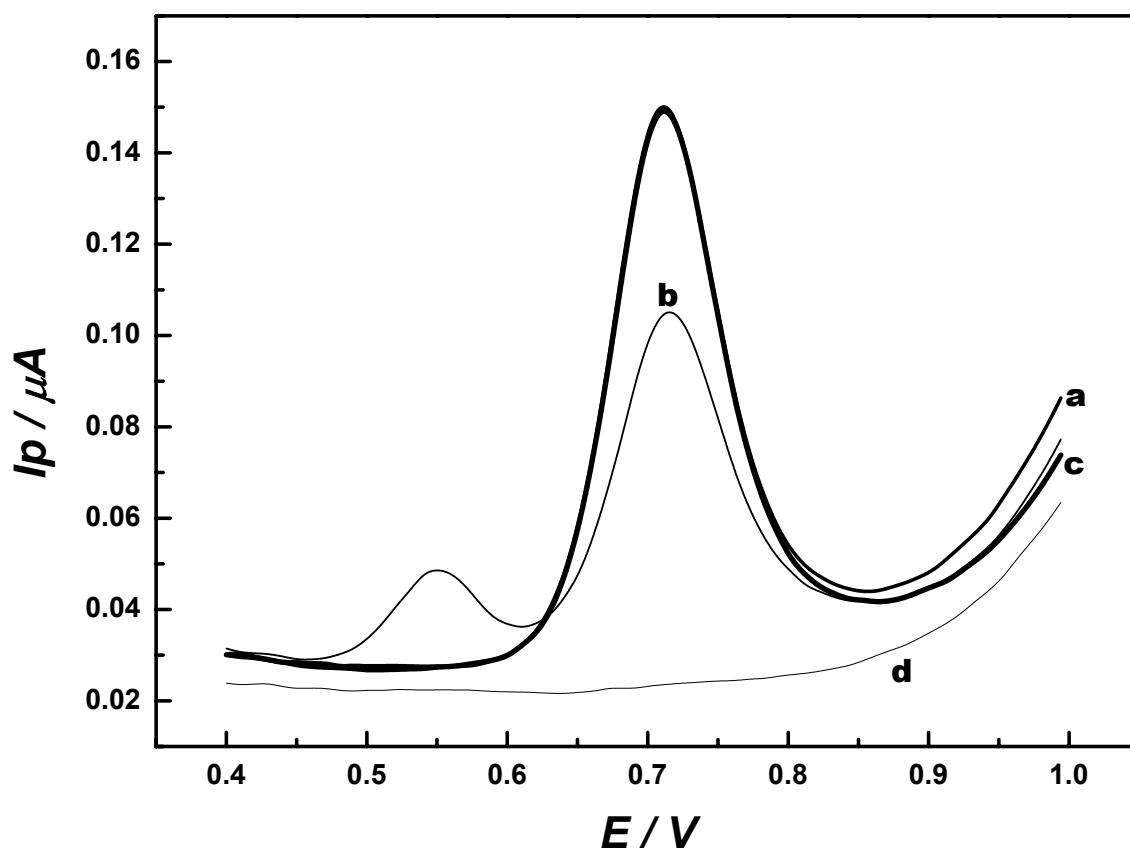


Figura 42: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB, em solução de PQ $0,01 \text{ mmolL}^{-1}$, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. **(a)** 1ª varredura; **(b)** 2ª varredura, sem limpeza do eletrodo; **(c)** 3ª varredura, após agitação da solução; **(d)** branco. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V.

Comparando-se os voltamogramas de pulso diferencial registrados em solução de PQ com o EDDB (Fig. 42) com aqueles registrados com o ECV, nota-se, como já era esperado, uma variação de linha base, queda na intensidade de corrente, e aparecimento de pico a partir da 2^a varredura, a potenciais de aproximadamente + 0,54 V, correspondente à oxidação do produto de oxidação da PQ (estrutura VI) Figura 43.

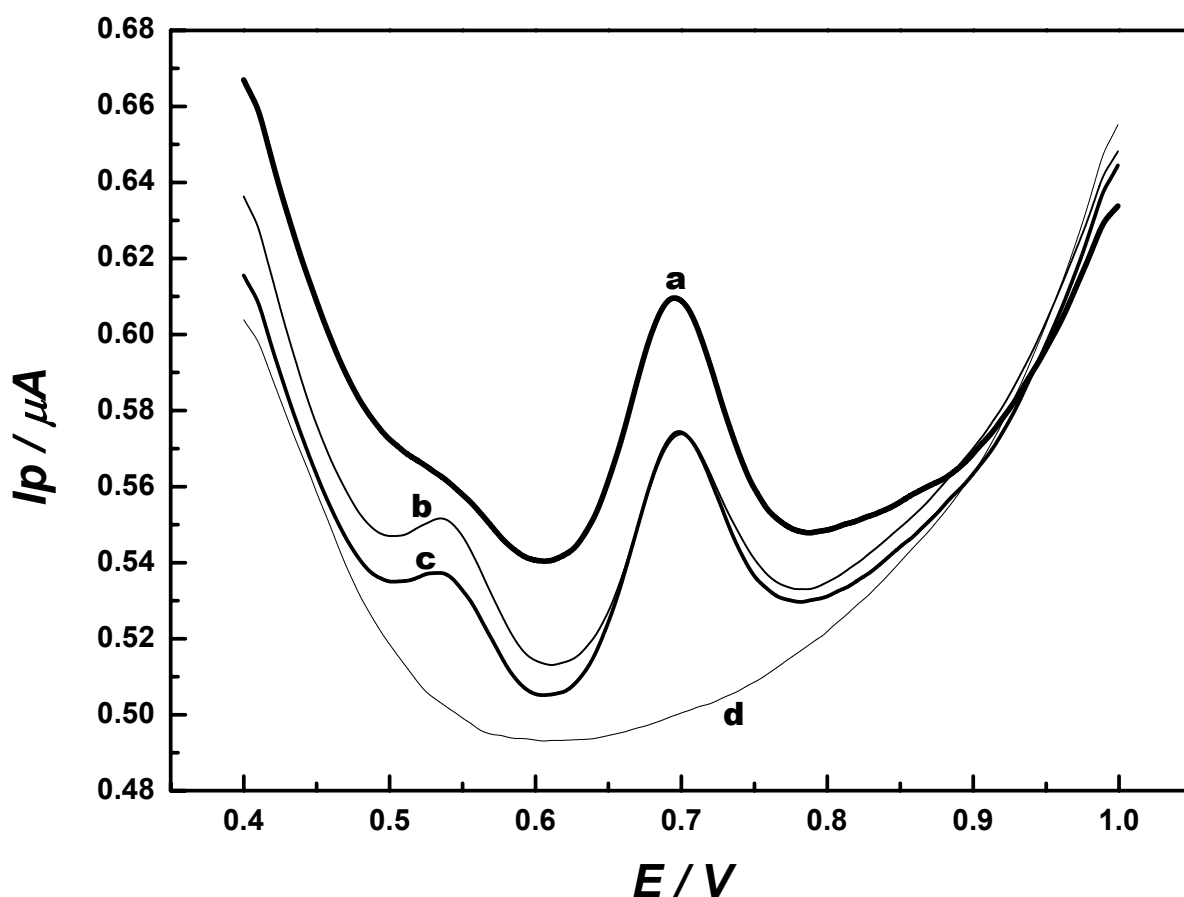


Figura 43: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com ECV, em solução de PQ $0,01 \text{ mmolL}^{-1}$, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. (a) 1^a varredura; (b) 2^a varredura, sem limpeza do eletrodo; (c) 3^a varredura, após agitação da solução; (d) branco. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $\nu = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V.

Deste modo, o EDDB foi então empregado para realizar as medidas subsequentes. A curva analítica, realizada no intervalo de $(8,0 \times 10^{-7} \leq [\text{PQ}] \leq 1,5 \times 10^{-5}) \text{ molL}^{-1}$, é apresentada na Figura 44.

O limite de detecção calculado, considerando-se $\text{LD} = 3\text{SD}_{\text{branco}} / \text{coeficiente angular}$ [75], foi de $(1,3 \times 10^{-7} \pm 7,8 \times 10^{-9}) \text{ molL}^{-1}$, com uma sensibilidade de $0,080 \text{ A/cm}^2 \text{ molL}^{-1}$.

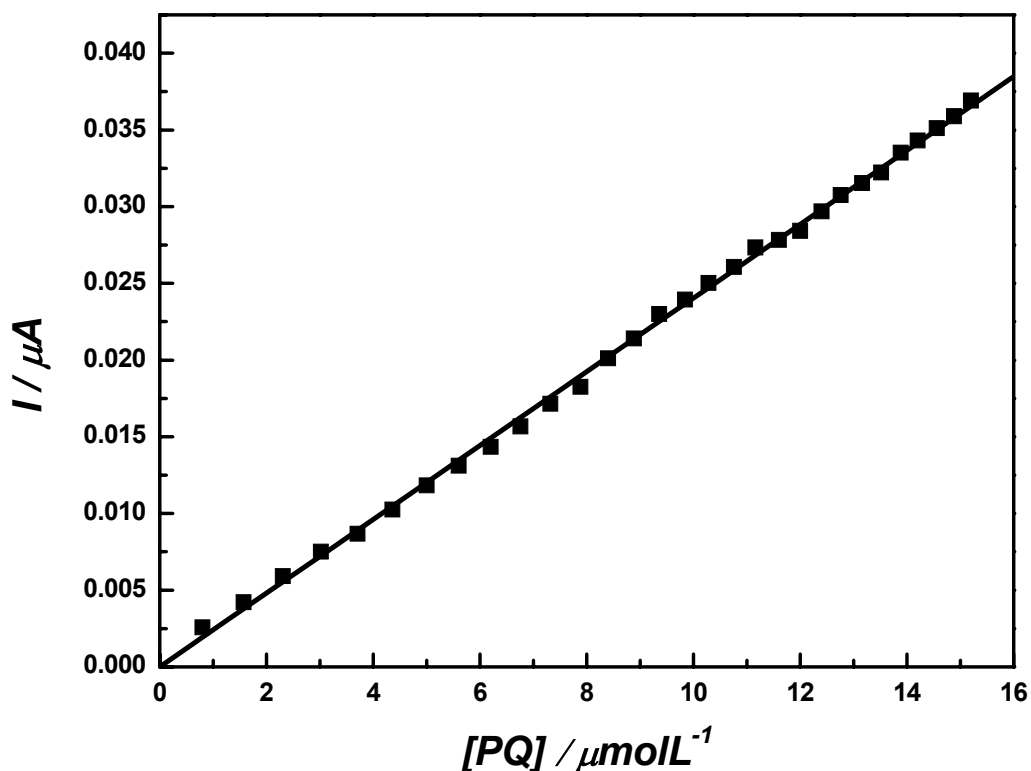


Figura 44: Curva analítica obtida a partir dos voltamogramas de pulso diferencial, registrados com EDDB em soluções padrão de PQ, em tampão BR, pH 2,15. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V. $(8,0 \times 10^{-7} \leq [\text{PQ}] \leq 1,5 \times 10^{-5}) \text{ molL}^{-1}$. Equação de reta: $I_p = (-1,4 \times 10^{-13} \pm 0,16 \times 10^{-14}) \text{ A} + (9,6 \times 10^{-3} \pm 0,062 \times 10^{-3}) \text{ molL}^{-1} \text{ PQ}$.

As determinações de PQ nos comprimidos comerciais foram realizadas em triplicata, pelo método da adição de padrão, em 3 amostras diferentes, tomadas de 3 cartelas. Os dados obtidos foram $(15,2 \pm 0,6)$ mg, com taxa de recuperação de $(101 \pm 4)\%$; $(14,9 \pm 0,17)$ mg, com taxa de recuperação de $(99,3 \pm 1,2)\%$; e $(14,9 \pm 1,2)$ mg, com taxa de recuperação de $(99,3 \pm 7,77)\%$. A Figura 45 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB, para determinação de PQ em formulação farmacêutica, empregando o método de adição de padrão. As respectivas curvas analíticas são apresentadas na Figura 46.

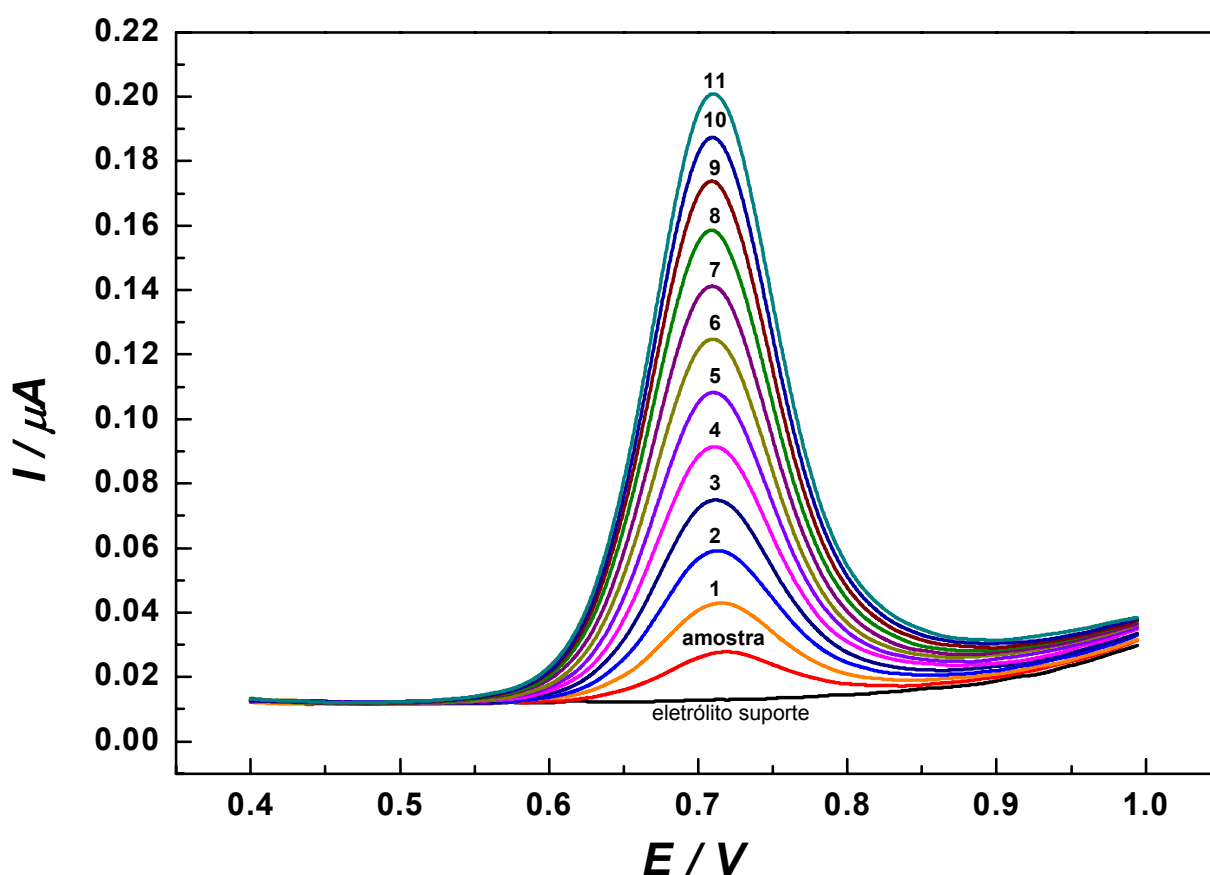


Figura 45: Voltamogramas de pulso diferencial registrados com EDDB, em solução amostra de PQ, em solução tampão Britton-Robinson, pH 2,15, antes e após adições sucessivas de PQ: 1 = $2,3 \mu\text{molL}^{-1}$; 2 = $2,5 \mu\text{molL}^{-1}$; 3 = $2,6 \mu\text{molL}^{-1}$; 4 = $2,7 \mu\text{molL}^{-1}$; 5 = $2,8 \mu\text{molL}^{-1}$; 6 = $2,9 \mu\text{molL}^{-1}$; 7 = $3,0 \mu\text{molL}^{-1}$; 8 = $3,1 \mu\text{molL}^{-1}$; 9 = $3,2 \mu\text{molL}^{-1}$; 10 = $3,3 \mu\text{molL}^{-1}$; 11 = $3,4 \mu\text{molL}^{-1}$. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4 \text{ V}$; $E_f = 1,0 \text{ V}$; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; amplitude, 0,06 V.

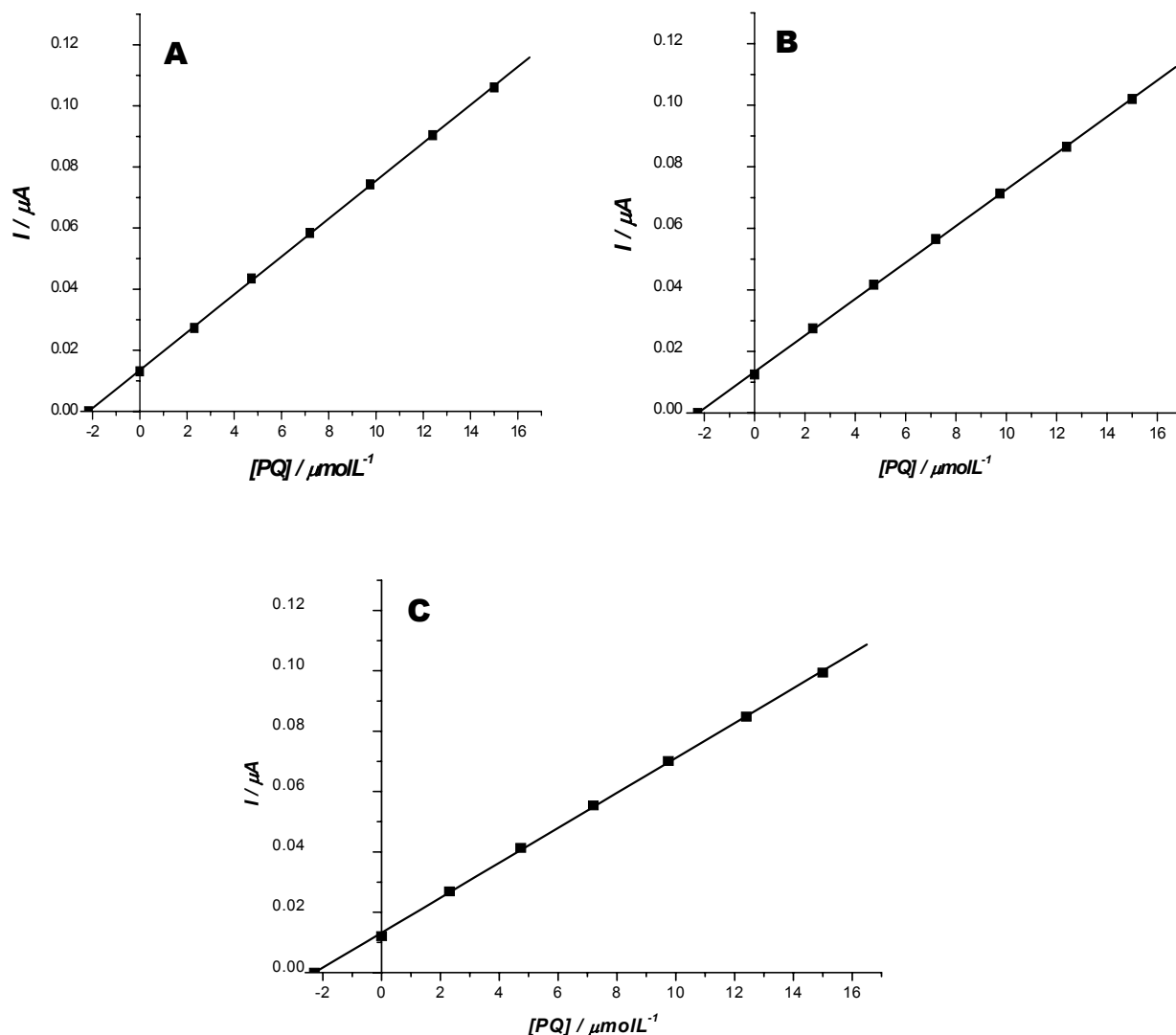


Figura 46: Curvas analíticas obtidas a partir do método de adição de padrão, com extrapolação, para 3 amostras diferentes. Dados obtidos de voltamogramas de pulso diferencial registrados em soluções com adições sucessivas de PQ, em tampão Britton-Robinson, pH 2,15. Condições experimentais: tempo de equilíbrio, 25s; tempo de modulação, 0,7s; intervalo de tempo, 1s; $E_i = 0,4$ V; $E_f = 1,0$ V; $v = 10$ mVs⁻¹; amplitude, 0,06 V. **A**: $I_p = (1,3 \times 10^{-8} \pm 2,5 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (6,2 \times 10^{-3} \pm 2,9 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$; **B**: $(1,3 \times 10^{-8} \pm 3,5 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (5,8 \times 10^{-3} \pm 4,2 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$; **C**: $(1,3 \times 10^{-8} \pm 2,6 \times 10^{-10}) \mu\text{A} + (5,9 \times 10^{-3} \pm 3,1 \times 10^{-5}) \mu\text{molL}^{-1}$.

De acordo com os dados apresentados, constata-se facilmente que o EDDB é uma superfície adequada para utilização no método analítico proposto. Os dados obtidos estiveram em acordo com aquele fornecido pelo fabricante, de 15 mg de PQ por comprimido.

4.4. Emprego de eletrodo esférico de diamante dopado com boro (EEDDB)

Em vista da oportunidade de se trabalhar com eletrodos esféricos de diamante dopado (EEDDB), avaliou-se o comportamento destes eletrodos em comparação àqueles planos (como o EDDB), os mais empregados e difundidos.

Utilizou-se voltametria cíclica e soluções de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, em KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$. Observou-se desvio de linearidade para mais altas velocidades de varredura, porém este comportamento só foi observado quando o eletrodo não foi retirado da solução e lavado, ao se variar o valor de v , Figura 47.

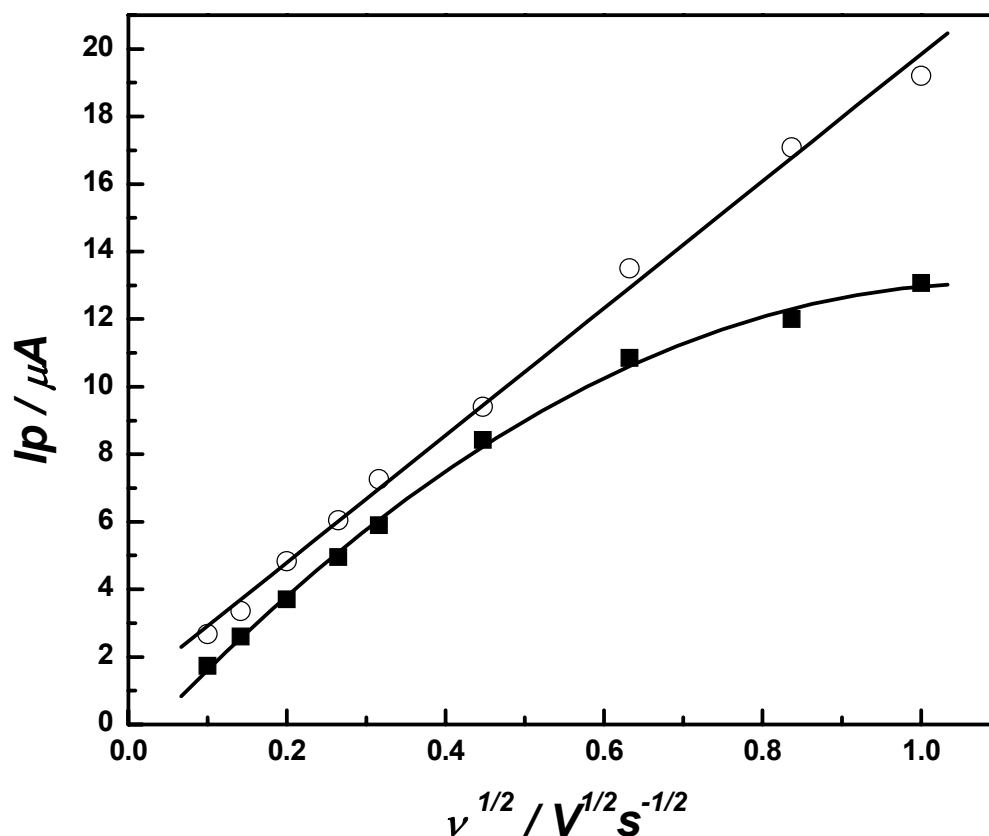


Figura 47: Variação da corrente de pico, I_p , em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos com EEDDB, em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte: lavando-se o EEDDB entre cada variação de v (○); na ausência de lavagem (■).

Constatou-se então, através dos dados apresentados na Figura 47, que na ausência de lavagem do eletrodo, o processo de transferência de carga deixa de ser controlado por difusão, com os valores de corrente de pico tendendo a um valor limite. Este comportamento foi então atribuído ao tipo de crescimento do filme de diamante no substrato de molibdênio, uma vez que este efeito não foi observado em eletrodo plano (EDDB), em que o substrato é silício e não sofre qualquer tipo de tratamento antes do crescimento, Figura 48.

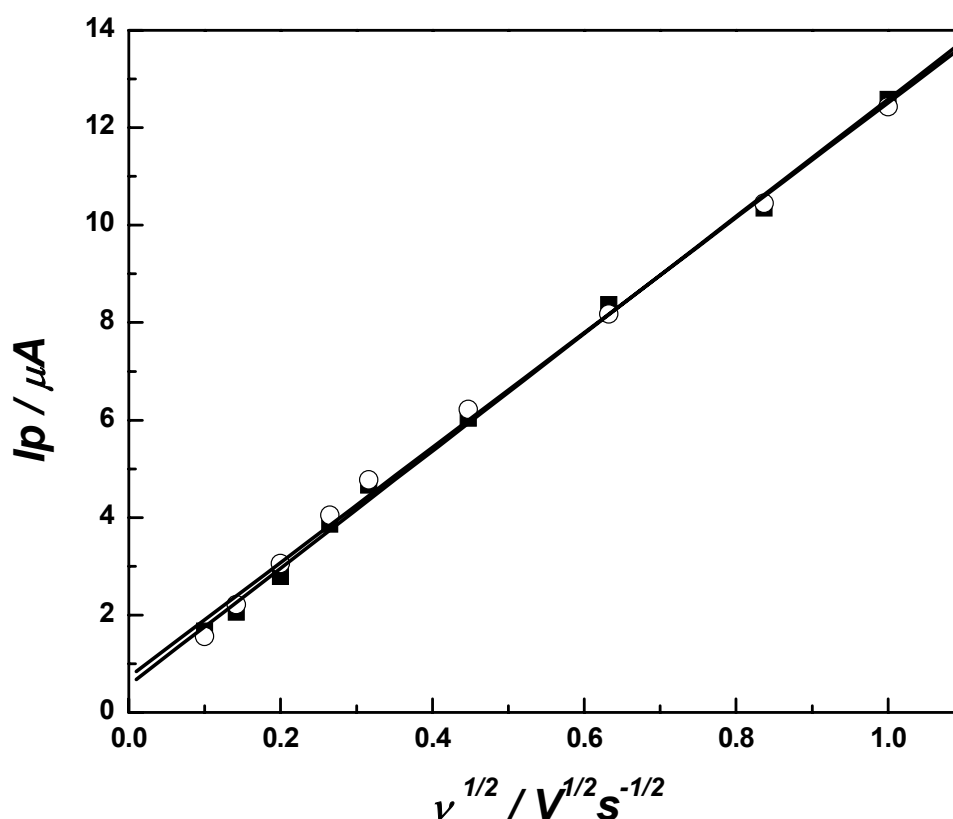


Figura 48: Variação da corrente de pico, I_p , em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados obtidos com EDDB (eletrodo plano), em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte: lavando-se o EDDB entre cada variação de v (○); na ausência de lavagem (■).

Para se compreender o desvio de linearidade apresentado na Figura 47, deve-se considerar que o EEDDB possui buracos em sua estrutura (originários do processo de pré-tratamento do substrato de molibdênio [72]), como pode ser visto na Figura 49. Portanto, o desvio da linearidade observado pode ser explicado assumindo que a difusão da espécie, a partir da superfície do EEDDB para dentro dos buracos é lenta, comparada com a difusão do seio da solução à superfície do EEDDB. Assim, a área disponível para o processo eletroquímico diminui, principalmente a maiores v e na ausência de limpeza superficial e a altas velocidades de varredura, as correntes de pico tendem a um valor limite e este comportamento pode ser atribuído à retenção prévia do material estudado dentro dos buracos, durante os voltogramas cíclicos registrados a baixas velocidades de varredura.

Foi descartada a possibilidade de ocorrência de uma alta resistência ôhmica interna, devido a um baixo nível interno de dopagem de boro se comparado com a dopagem externa [102]. Por outro lado, considerando que a fonte de boro usada foi gasosa e não sólida [102], a possibilidade de ocorrência de dopagem não-homogênea foi minimizada. Portanto, a maioria da área eletroquímica ativa do EEDDB é formada por buracos, sendo que as regiões planares superficiais são poucas.

Os resultados obtidos sugerem que estes eletrodos podem ser empregados como substratos para o desenvolvimento de EEDDB quimicamente modificados, para utilização nos mais variados tipos de aplicação. Por outro lado, tanto a miniaturização quanto a maior facilidade de montagem deste eletrodo, em relação ao EDDB (plano), facilita seu emprego em diferentes meios de análise e o uso de pequenos volumes de solução.

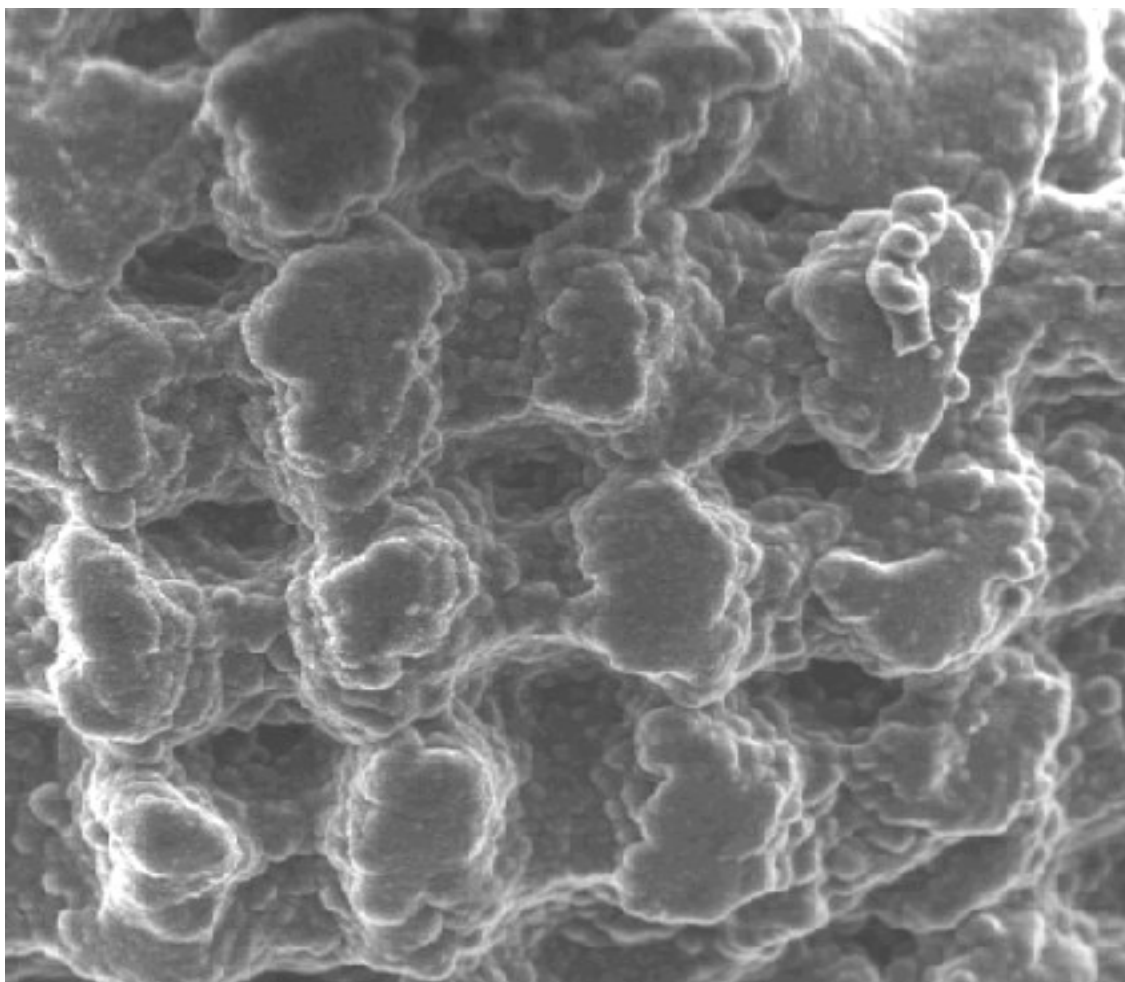


Figura 49: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura, mostrando os buracos presentes no filme de diamante dopado com boro, crescido sobre broca de molibdênio, para formar o EEDDB.

Dando seqüência aos experimentos, foram registrados voltamogramas cíclicos em solução de ferrocianeto de potássio, empregando os três eletrodos já usados, ECV, EDDB (plano) e EEDDB, nas mesmas condições, para efeito comparativo. Na Figura 50 vêem-se os voltamogramas obtidos. Os resultados tanto em termos de corrente de pico quanto de ΔE_p usando-se o EEDDB são melhores, quando comparados aos outros eletrodos.

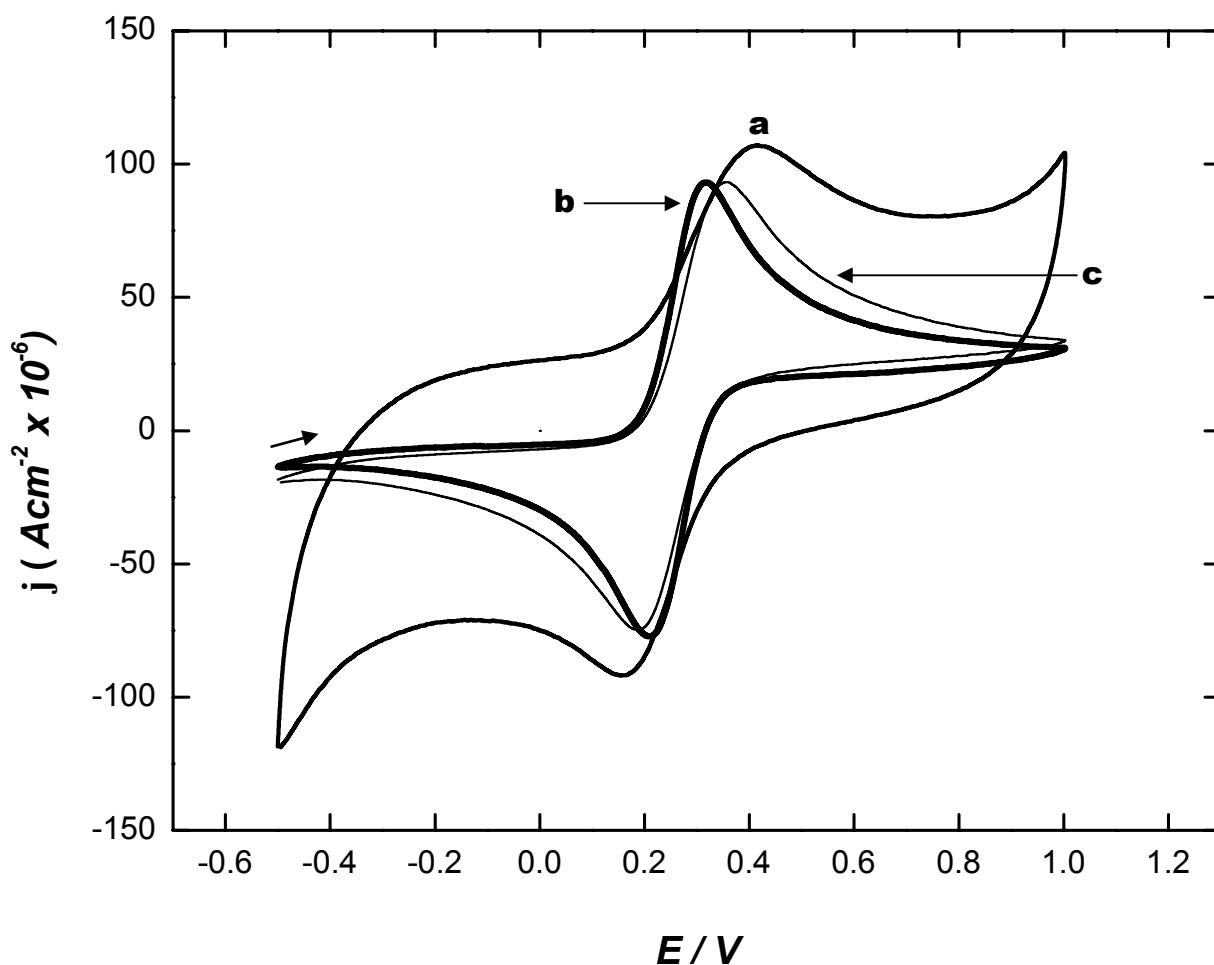


Figura 50: Voltamogramas cíclicos apresentados em densidade de corrente de pico, registrados em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ desaerada, contendo nitrato de potássio $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. **(a)** eletrodo de carbono vítreo; **(b)** EEDDB; **(c)** EDDB. Os valores para o ECV foram divididos por um fator de 2 para se ajustar na mesma escala.

Diferentes parâmetros voltamétricos foram considerados, para avaliar o desempenho dos 3 eletrodos. O principal objetivo foi verificar a concordância de resposta entre eles, usando alguns critérios de quasi-reversibilidade. Assim, a corrente de pico aumenta com $\nu^{1/2}$; ΔE_p foi maior que $59/n \text{ mV}$ e aumentou com ν ; a razão das correntes de pico ficou em torno de 1, variando de 0,94 a 1,1, para os 3 eletrodos. As características de quasi-reversibilidade em relação a ΔE_p são confirmadas pelos dados obtidos para os 3 eletrodos, como pode ser visto na Figura 51. O ΔE_p aumentou com ν para os 3 eletrodos, sendo mantido no menor patamar com

o eletrodo esférico, em todo intervalo de velocidades de varredura empregadas, o que evidencia um melhor comportamento de reversibilidade, típico para este sistema redox estudado.

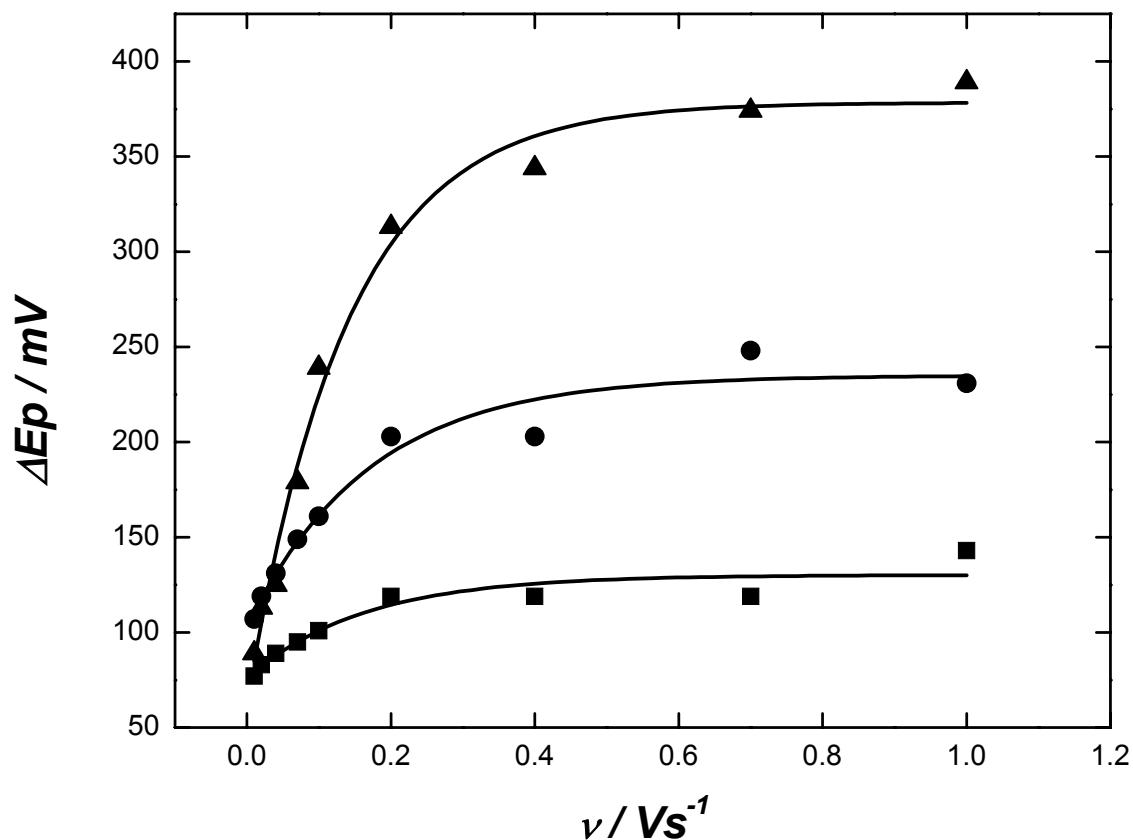


Figura 51: Variação de ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$) em função da velocidade de varredura, em solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, contendo nitrato de potássio $1,0 \text{ molL}^{-1}$ como eletrólito suporte. \blacktriangle : ECV; \bullet : EDDB; \blacksquare : EEDDB. Eletrodos lavados entre as medidas.

Finalmente, o desempenho deste eletrodo em termos de capacitância foi comparado ao do EDDB e ao do ECV, no que diz respeito à corrente de fundo. A Figura 52 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados em solução contendo apenas o eletrólito suporte KNO_3 .

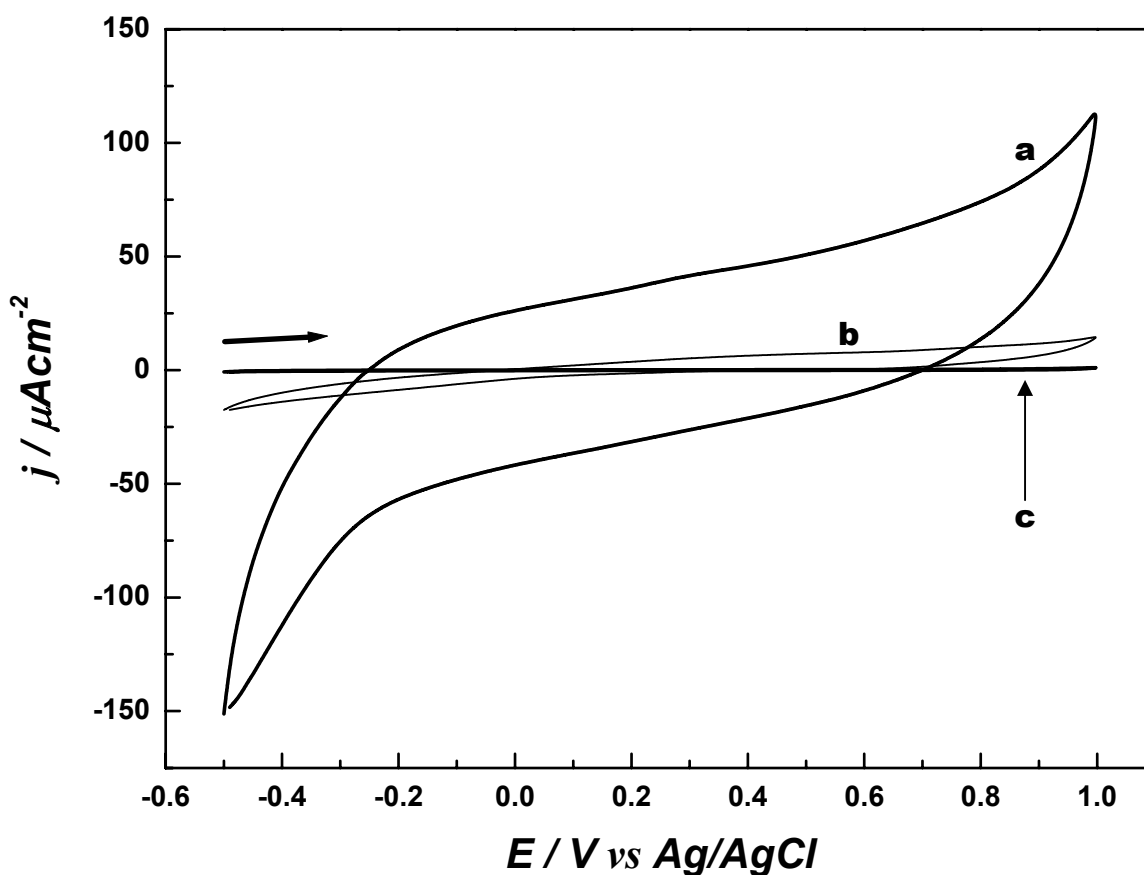


Figura 52: Voltamogramas cíclicos apresentados em densidade de corrente de pico, registrados em solução desaerada de eletrólito suporte KNO_3 $1,0 \text{ molL}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$. **(a)** ECV; **(b)** EDDB; **(c)** EEDDB.

Os resultados de capacitância mostraram valores de mesma ordem de magnitude para os eletrodos de diamante, os quais foram cerca de 200 vezes menores que o valor apresentado pelo eletrodo de carbono vítreo.

Os dados de capacitância, para os 3 eletrodos, são mostrados na Figura 53.

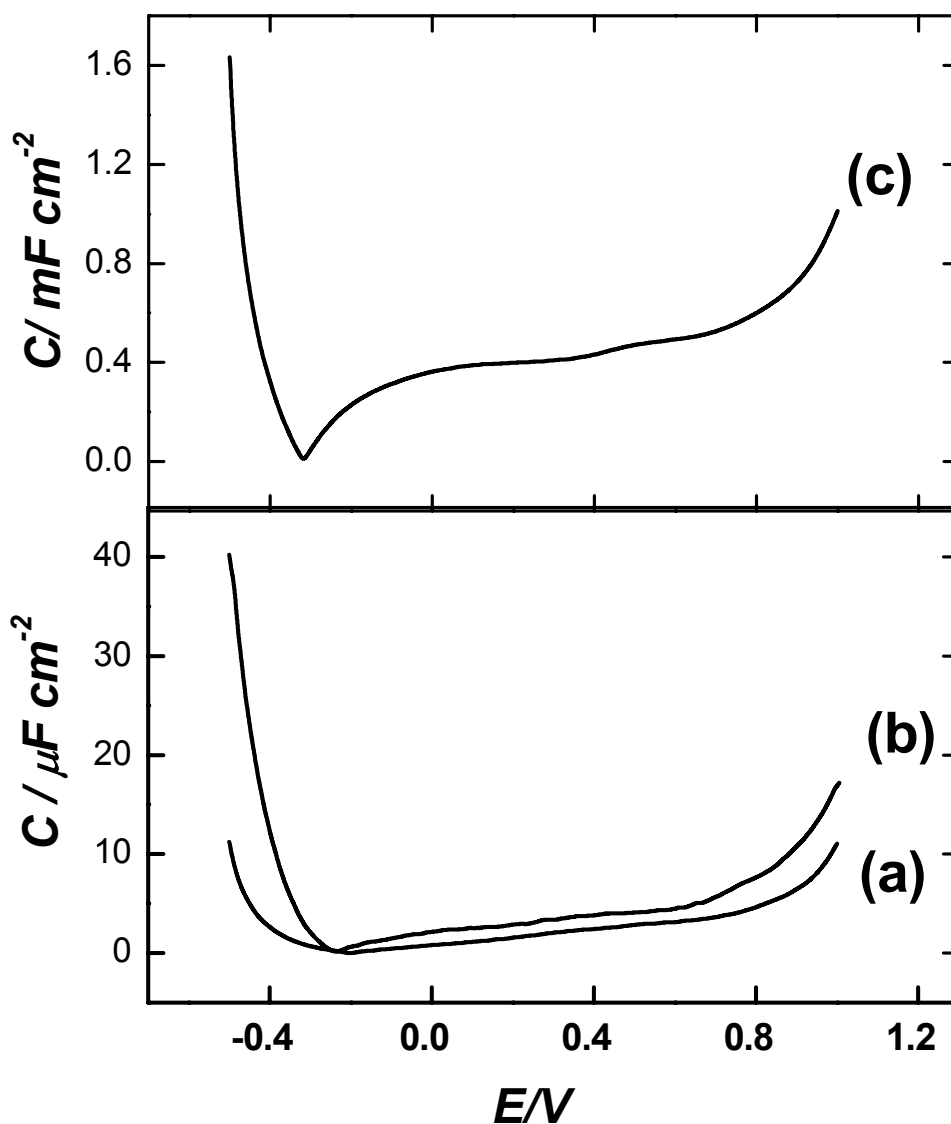


Figura 53: Valores de capacitância obtidos dos voltamogramas cíclicos em função do potencial aplicado. (a) EDDB; (b) EEDDB; (c) ECV.

Pelos resultados obtidos, nota-se que existe grande possibilidade de implementar o desempenho analítico dos eletrodos de diamante dopado com boro alterando-se apenas a geometria do eletrodo e trabalhando-se em sistema em fluxo contínuo, por exemplo. Este fato, juntamente com as características próprias do diamante, explica a boa performance apresentada pelos eletrodos de diamante, de maneira geral, nas áreas de eletrossíntese e eletroanálise.

5. CONCLUSÕES

5.1. Avaliação dos resultados obtidos

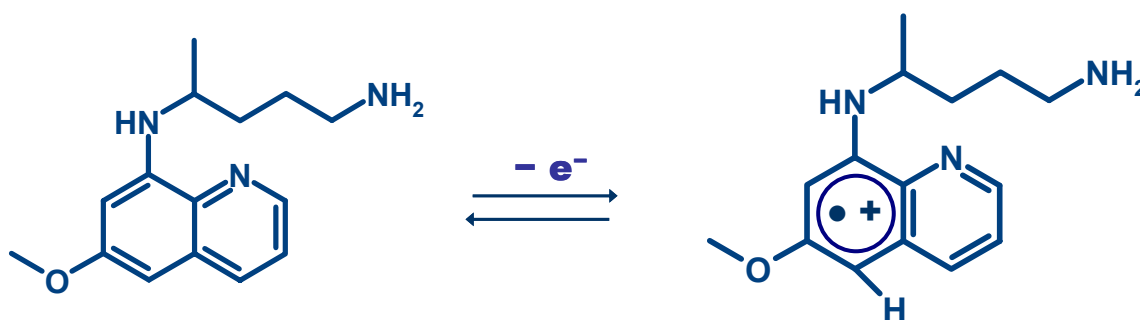
Conforme discutido na seção 1.2., o mecanismo de ação da PQ tem sido estudado, mas não foi ainda completamente estabelecido. O mais provável é que espécies intermediárias, formadas durante o metabolismo da PQ, estejam envolvidas no ataque a diferentes estágios do parasito [6,8,11-13]. Sabe-se também que a PQ sofre processo redox durante sua biotransformação, com produção de metabólitos como carboxiprimaquina ou 5-hidroxiprimaquina, dentre outros já identificados em amostras biológicas [12,13]. No entanto, não há um mecanismo que explique as etapas iniciais envolvidas na formação de tais metabólitos, a partir da molécula de PQ.

Um consenso que se observa entre os pesquisadores é que a 5-HPQ talvez seja o principal metabólito envolvido na atividade antiparasitária da PQ [12,13,16,17,22,23,25]. Fletcher *et al.* [12] consideraram relevante a probabilidade da produção de espécies ativas de oxigênio e radicais livres, a partir das reações de metabólitos hidroxilados na posição 5 da PQ. Idowu *et al.* [16] propuseram que a PQ produz inicialmente 5-HPQ ou 3'-HPQ como metabólitos principais, os quais subsequentemente formam outros compostos. Por outro lado, identificaram a 5-H-6DPQ como o principal metabólito nos microsossomos de ratos e mostraram que, em sua produção, a hidroxilação da posição 5 da molécula de PQ ocorre antes da desmetilação do grupo metóxi da posição 6. Augusto *et al.* [22] discutiram a hipótese de que a PQ poderia agir primeiro sofrendo oxidação a um fenol, para em seguida originar uma quinonaimina. Vásquez-Vivar e Augusto [13,23] consideraram que a diferença principal entre a 5-HPQ e os outros metabólitos hidroxilados estudados, é a maior probabilidade de formação do radical semi-

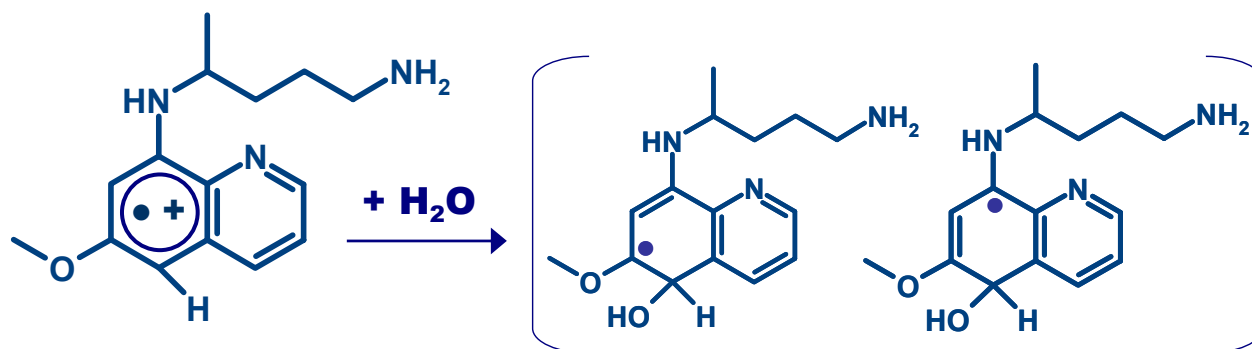
quinonaimina a partir da 5-HPQ, o qual poderia explicar tanto a hemotoxicidade da PQ quanto sua ação antiparasitária.

Portanto, o que se pode concluir do trabalho destes autores, sendo um dado importante do estudo do metabolismo da PQ, é que a hidroxilação da posição 5 parece ser o primeiro passo do processo metabólico, pois originalmente não há grupo substituinte nesta posição de sua molécula (fig. 1). Desta forma, nossos resultados confirmaram a formação da 5-HPQ a partir da molécula de PQ, como sugerido por Idowu *et al.* [16] e para que a 5-HPQ esteja presente como metabólito, haveria necessidade de hidroxilação da posição 5 da PQ, conforme considerado por Augusto *et al.* [22].

As informações obtidas através dos métodos eletroanalíticos empregados possibilitaram a proposição de um mecanismo de oxidação da PQ, que coincide com tal inferência. Houve indícios de ocorrência de uma oxidação inicial, seguida de reação química acoplada, já que se observou-se queda da função de corrente em função de v . Obteve-se um pico único de oxidação de caráter irreversível, com sobreposição de picos perceptível apenas em meio não-aquoso. A determinação experimental do número de elétrons envolvidos na etapa inicial sugeriu o envolvimento de 1 elétron, o que nos conduziu à proposição da formação de um cátion radical. Posteriormente, em meio aquoso, ocorreria então a hidroxilação do anel aromático na posição 5 da molécula, conforme etapas a seguir:



Oxidação da PQ e formação de cátion radical



Hidroxilação na posição 5 da molécula

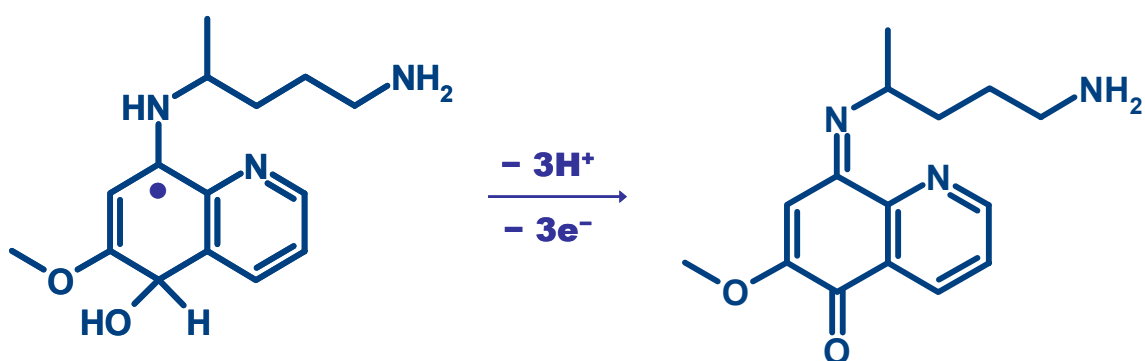
Sabe-se que a reação preferencial de um cátion radical em meio contendo um nucleófilo, no caso a água, é a hidroxilação [77]. Portanto, esta reação é a mais provável neste ponto do processo.

Cabe lembrar que em meio de DMF, o pico principal de oxidação da PQ apresentou caráter quasi-reversível ao mesmo tempo em que a formação de 5-HPQ foi dificultada, conclusão esta corroborada pela diminuição das correntes de pico do par redox detectado a potenciais menos positivos.

Corroborar-se, desta maneira, a probabilidade de produção inicial do metabólito hidroxilado na posição 5 [16,22], já que no organismo a PQ também sofre processo redox, e todo o sistema está em meio aquoso, no mesmo pH em que os estudos eletroquímicos foram realizados. Por outro lado, partindo-se então da 5-HPQ e pensando-se em termos tanto de hemotoxicidade quanto de ação antiparasitária [23,25], pode-se ter então a presença de espécies muito reativas no meio intracelular: o cátion radical produzido inicialmente pela oxidação da PQ, ou

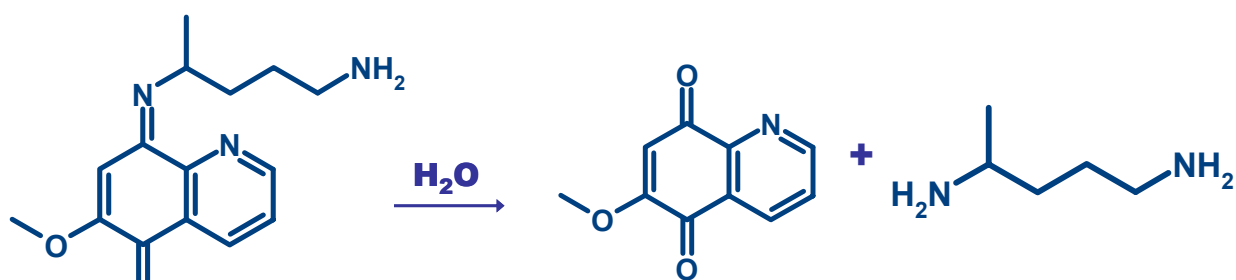
o radical semiquinonaimina formado principalmente a partir de 5-HPQ [13,23]. A ação destes radicais poderia ser diretamente sobre o parasito, ou indiretamente, através da participação no ciclo de produção de outras espécies reativas, as quais causariam estresse no parasito. O mecanismo aqui proposto também mostra claramente que os estudos envolvendo o mecanismo de ação da PQ não podem ser considerados, sob o ponto de vista biológico, a partir de seu principal metabólito (5-HPQ), já que para se chegar a este metabólito tem-se a formação de radicais livres a partir da PQ.

A etapa seguinte seria outro processo eletroquímico, envolvendo a perda de 3 elétrons e 3 prótons, para formação do respectivo composto quinonaimínico, como visto a seguir. A variação nos potenciais de pico obtidos por voltametria cíclica, com o pH, sugere de fato o envolvimento de prótons na reação de transferência de carga. A obtenção do número de elétrons igual a 1, como dito anteriormente, é coerente, apesar do processo total proposto envolver a participação de 4 elétrons, devido à etapa limitante provavelmente ser a formação do cátion radical. Deve-se ressaltar que, por qualquer dos métodos usados para a determinação do número de elétrons, sempre se obteve valor próximo de 1 elétron.



Oxidação e formação de composto quinonaimínico

Uma possibilidade, nesta altura, seria a formação do radical semiquinonaimina [13,23]. Como não temos evidência da ocorrência da produção deste radical, principalmente por se ter trabalhado em meio aquoso e pelo produto formado ser uma imina, a hipótese da ocorrência de hidrólise desta última foi considerada, como visto a seguir, já que este tipo de composto hidrolisa facilmente em meio aquoso:

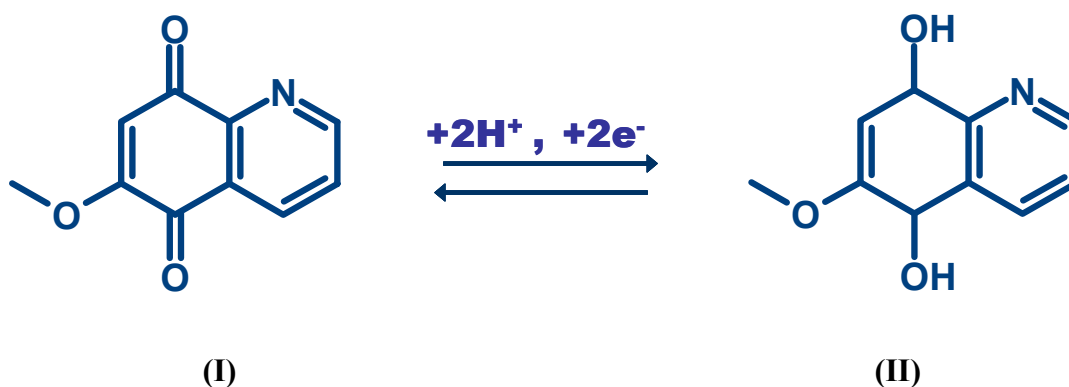


Hidrólise do composto quinonaimínico

Desta forma pode-se considerar, do ponto de vista biológico, a ação antiparasitária da PQ e/ou seus efeitos colaterais, não somente a partir de algum dos seus metabólitos, mas principalmente partindo do cátion radical, ou mesmo da quinona. Cátions radicais são intermediários importantes em muitas reações de oxidação e redução, observadas em fenômenos biológicos [77,87].

A hipótese tanto do ataque nucleofílico ao cátion radical, quanto da hidrólise da imina, pode ser corroborada pela realização dos experimentos em meio não aquoso, de DMF. Observou-se por voltametria cíclica um novo pico catódico, o qual não foi observado quando se trabalhou com PQ em meio aquoso. Considerou-se como sendo um componente quase-reversível em relação ao pico principal da PQ. Ele pode estar então relacionado ou à redução do cátion radical inicialmente formado, ou à redução do composto quinonaimínico, presente apenas quando não acontece a hidrólise.

Finalmente, o composto quinoidal formado após a hidrólise, é reduzido no sentido inverso da varredura de potencial formando o derivado hidroquinoidal, o qual se oxida no sentido direto, já então na 2ª varredura, estabelecendo-se assim o par redox do derivado quinoidal/hidroquinoidal da PQ.



Par redox do derivado quinoidal/hidroquinoidal da PQ

Estudos individualizados e comparativos dos compostos, isoladamente, não foram considerados *a priori*, porque muitos deles têm características cromatográficas, ou espectrométricas, muito parecidas [16]. Um dado mais conclusivo poderia ser acrescentado a este mecanismo, se fosse possível a realização de experimentos com os derivados quinoidais da PQ, 6-metoxi-5,8-quinolinadiona (I) e 6-metoxi-5,8-quinolinadiol (II). Isto não se concretizou, pois tais compostos não estão à venda. Apesar disto, medidas experimentais realizadas em solução de 5-HPQ confirmaram os picos voltamétricos a ela atribuídos durante a oxidação da PQ.

A dimerização da PQ não foi considerada no mecanismo proposto, pois não se observou picos múltiplos na VC, há impedimento estérico da molécula de PQ, e, o mais provável, este tipo de processo só acontece, para moléculas aromáticas, em meio de baixa nucleofilicidade, que não foi o caso [93].

Portanto, chegou-se finalmente à proposição de um mecanismo completo de oxidação eletroquímica da PQ, coerente com os dados disponíveis até agora tanto especificamente a respeito da PQ [12,13,16,17,22,23,25], quanto relacionados a classes mais amplas de compostos orgânicos, dentro das quais a PQ se inclui [78-86]. Este mecanismo pode servir de base para estudos mais aprofundados sobre tal fármaco, tendo em vista suas aplicações como fármaco com atividade antimalárica ou antichagásica.

Com relação à utilização de diferentes eletrodos na proposição do mecanismo de oxidação da PQ, o emprego do EDDB não foi decisivo para o esclarecimento do mecanismo de oxidação aqui proposto, devido principalmente, e justamente, à ausência de processo adsorptivo sobre sua superfície, ao contrário do que se observou com ECV. No entanto, a ausência destes efeitos nos mostrou claramente que em ECV, os intermediários de reação estavam sendo imobilizados. A ausência de efeitos de adsorção se deve fundamentalmente à diferença de espécies superficiais disponíveis para facilitar a adsorção. Sabe-se que o diamante altamente dopado, usado nos experimentos, tem grande número de defeitos de rede e mais ligações sp e sp^2 que o diamante menos dopado. No entanto, não se sabe como é formada a superfície do ECV, pois o eletrodo não vem de fábrica com qualquer informação detalhada sobre o tratamento térmico sofrido durante sua produção, nem com estudo de caracterização que indique as espécies presentes na sua superfície. Conseqüentemente, não é possível a realização de qualquer comparação entre os 2 eletrodos sob este ponto de vista. Apesar disto, o uso do EDDB foi fundamental para corroborar o envolvimento de 1 elétron no pico principal de oxidação da PQ.

As informações sobre capacitância reafirmaram a importância da baixa corrente de fundo observada com os eletrodos de diamante em comparação com o ECV. Num eletrodo semiconductor, isto provavelmente se deve a que praticamente toda a variação de potencial na

área interfacial ocorre na região de carga espacial e, neste caso, a capacitância varia de 0,001 a $1 \mu\text{F cm}^{-2}$, enquanto que a capacitância da dupla camada, para os demais materiais, varia de 10 a $100 \mu\text{F cm}^{-2}$. A baixa corrente de fundo do diamante pode ser explicada por 3 fatores: ausência de funcionalidades carbono-oxigênio eletroativas na superfície; baixa densidade superficial de transportadores de carga com conseqüente pouca acumulação de íons ou dipolos; estruturação do filme como um arranjo de microeletrodos [103].

Conseqüentemente, o EDDB apresentou-se como o eletrodo mais adequado para a determinação analítica da PQ. Seu pouco ou nenhum caráter adsorptivo possibilitou o uso do EDDB na determinação de PQ em comprimidos comerciais, já que se fez apenas a renovação da solução na região da superfície do eletrodo, pois não se observou processo algum que a bloqueasse. Por outro lado, a baixa corrente de fundo e a estabilidade da linha base facilitam sobremaneira a realização de experimentos em concentrações muito pequenas de analito, o que se reflete na obtenção de baixos limites de detecção em determinações analíticas.

Os resultados da determinação analítica mostraram concordância com o valor fornecido pelo fabricante. Foi possível a realização de, no mínimo, 200 leituras sem perda da qualidade de resposta do eletrodo de diamante.

O EEDD deve ser alvo de estudos minuciosos, que o viabilize como material suporte para construção de eletrodos quimicamente modificados.

A disponibilização, pelo laboratório de crescimento de diamante do INPE, dos dados de crescimento e de caracterização superficial dos filmes de diamante dopado, foi fundamental para o acompanhamento dos resultados eletroquímicos. Assim, pode-se optar por filmes mais dopados, sabendo-se quais suas características, para fixação de parâmetros para trabalhos futuros.

5.2. Perspectivas futuras

Um aspecto importante, decorrente do mecanismo proposto para a oxidação da PQ, é a formação de um cátion radical já na primeira etapa de reação. Considerando-se que nosso grupo tem, ao longo dos anos, adquirido experiência na modificação de superfícies com as bases do DNA e a própria molécula do DNA, a perspectiva futura é a de modificação de eletrodos de diamante em soluções de guanina e a utilização destas superfícies assim modificadas para efetuar a eletro-oxidação de PQ. O cátion radical formado poderia, deste modo, interagir com a base imobilizada na superfície do eletrodo, produzindo PQ e 8-oxo-guanina, produto de oxidação da guanina, passível de ser detectado por oxidação a baixos potenciais aplicados.

O eletrodo seria modificado, seguindo procedimentos já estabelecidos [104], ou a partir de alterações deste método, que se façam necessárias. Um estudo comparativo para verificação desta possibilidade poderia ser realizado com 5-HPQ. Neste caso, espera-se que não haja qualquer alteração na guanina imobilizada, pois não há formação do cátion radical. Se, ao contrário, houver oxidação da guanina, pode-se pensar sobre a formação de outros intermediários reativos, inclusive do radical semiquinonaimina. Como as interações com guanina devem ser *a priori* diferentes em cada caso, partindo-se de PQ ou 5-HPQ, espera-se que se possa distinguir os 2 processos, principalmente pela posição dos potenciais de pico, ou mesmo avaliando a eventual interação radical-guanina em janelas reduzidas de potencial, que restrinjam os processos envolvidos.

Outras propostas de trabalho podem surgir com emprego de eletrodos de diamante produzidos a partir de filmes com diversos níveis de dopagem. Assim seriam avaliadas as alterações na resposta dos eletrodos, em função do nível de dopagem, que possibilitassem

estabelecer diferentes aplicações para cada um deles. Neste caso, estudos de caracterização superficial seriam essenciais, para o acompanhamento de eventuais modificações dos eletrodos, em função da dopagem. Como já existem muitas informações a respeito da PQ, utilizando-se diferentes técnicas eletroquímicas, esta substância poderia ser utilizada como base para os experimentos. A partir disto, outras classes de compostos de interesse seriam usadas, já tendo efetuado a escolha do nível de dopagem de eletrodo para um objetivo específico.

Considerando-se apenas os eletrodos de diamante, inúmeros campos de pesquisa se abrem, desde que se disponha de dados fundamentais sobre o crescimento dos filmes. Só assim pode-se ter um entendimento completo dos processos que estão se desenvolvendo durante os experimentos, na superfície dos eletrodos. Como o nosso laboratório possui uma colaboração profícua com o Grupo de Crescimento de Diamante do INPE, este tipo de trabalho pode ser feito em detalhes.

Outra possibilidade que se mostra neste sentido, é a utilização de diferentes espécies de materiais carbonosos para posterior produção de eletrodos de diamante [52,55,56,58], mas sobre os quais todas as informações relativas à caracterização superficial seriam disponibilizadas pelo grupo do INPE, de modo a viabilizar o entendimento dos processos eletródicos observados. Desta forma, facilitar-se-ia a seleção de um determinado material para um uso específico: que tenha maior área superficial mas reduzido tamanho final, que tenha maior flexibilidade de montagem do eletrodo final, que seja um microeletrodo, etc.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHUNG, M.-C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos**. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1996.
2. CHUNG, M.C.; GONÇALVES, M.F.; COLLI, W.; FERREIRA, E.I.; MIRANDA, M.T.M. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.86, n.10, p.1127-1131, 1997.
3. CHUNG, M.C.; GÜIDO, R.V.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.A.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.11, p.4779-4783, 2003.
4. BAIRD, J.K.; RIECKMANN, K.H. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? **Trends in Parasitology**, v.19, n.3, p.115-120, 2003.
5. BAIRD, J.K.; FRYAUFF, D.J.; HOFFMAN, S.L. Primaquine for prevention of malaria in travelers. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.1659-1667, 2003.
6. BAIRD, J.K.; HOFFMAN, S.L. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.1336-1345, 2004.
7. National Centers for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Malaria.htm> ou <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>. Acesso em 24/08/2006.

8. Drug Information for the Health Care Professional – USP DI, v.1, 21^a ed.; pp. 2474-2476, Micromedex – Thomson Healthcare, 2001.
9. GOODWIN, T.E.; BOYLAN, C.J.; CURRENT, W.L.; BYRD, J.C.; EDWARDS, C.B.; FULLER, D.A.; GREEN, J.L.; LAROCCA, C.D.; RANEY, K.D.; ROSSA, A.S.; TUCKERA, W.A. Enhanced *Pneumocystis carinii* activity of new primaquine analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, p.2205-2208, 2000.
10. EGAN, T.J. Chloroquine and primaquine: combining old drugs as a new weapon against *falciparum* malaria? **Trends in Parasitology**, v.22, n.6, p.235-237, 2006.
11. LÓPEZ-ANTUÑANO, F.J. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? **Salud Pública de México**, v.41, n.5, p.410-419, 1999.
12. FLETCHER, K.A.; BARTON, P.F.; KELLY, J.A. Studies on the mechanisms of oxidation in the erythrocyte by metabolites of primaquine. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.37, n.13, p.2683-2690, 1988.
13. VÁSQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Oxidative activity of primaquine metabolites on rat erythrocytes in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.47, n.2, p.309-316, 1994.
14. GRAVES, P.R.; KWIEK, J.J.; FADDEN, P.; RAY, R.; HARDEMAN, K.; COLEY, A.M.; FOLEY, M.; HAYSTEAD, T.A.J. Discovery of novel targets of quinoline drugs in the human purine binding proteome. **Molecular Pharmacology**, v.62, n.6, p.1364-1372, 2002.

15. BAKER, J.K.; YARBER, R.H.; NANAYAKKARA, N.P.D.; McCHESNEY, J.D.; HOMO, F.; LANDAU, I. Effect of aliphatic side-chain substituents on the antimalarial activity and on the metabolism of primaquine studied using mitochondria and microsome preparations. **Pharmaceutical Research**, v.7, n.1, p.91-95, 1990.
16. IDOWU, O.R.; PEGGINS, J.O.; BREWER, T.G. Side-chain hydroxylation in the metabolism of 8-aminoquinoline antiparasitic agents. **Drug Metabolism and Disposition**, v.23, n.1, p.18-27, 1995.
17. STROTHER, A.; FRASER, I.M.; ALLAHYARI, R.; TILTON, B.E. Metabolism of 8-aminoquinoline antimalarial agents. **Bulletin of the World Health Organization**, v.59, n.3, p.413-425, 1981.
18. CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; McCHESNEY, J.D. Primaquine: metabolism by microorganisms and ^{13}C nuclear magnetic resonance assignments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.19, n.2, p.337-341, 1981.
19. McCHESNEY, J.C.; SARANGAN, S. Rapid aromatic hydrogen exchange in the antimalarial primaquine. **Pharmaceutical Research**, p.184-186, 1984.
20. AUGUSTO, O.; WEINGRILL, C.L.V.; SCHREIER, S.; AMEMIYA, H. Hydroxyl radical formation as a result of the interaction between primaquine and reduced pyridine nucleotides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Washington, v.244, n.1, p.147-155, 1986.
21. AUGUSTO, O.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W.; FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.135, n.3, p.1029-1034, 1986.

22. AUGUSTO, O.; SCHREIBER, J.; MASON, R.P. Direct ESR detection of a free radical intermediate during the peroxidase-catalyzed oxidation of the antimalarial drug primaquine. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.37, n.14, p.2791-2797, 1988.
23. VÁSQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.267, n.10, p.6848-6854, 1992.
24. BOLCHOZ, L.J.C.; BUDINSKY, R.A.; MCMILLAN, D.C.; JOLLOW, D.J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.297, n.2, p.509-515, 2001.
25. BOWMAN, Z.S.; OATIS, JR.; J.E.; WHELAN, J.L.; JOLLOW, D.J.; MCMILLAN, D.C. Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.309, p.79-85, 2004.
26. KAUFFMAN, J.M.; PEKLI-NOVAK, M.; NAGY, A. The potential of electroanalytical techniques in pharmaceutical analysis. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, Budapest, v.66, n.2, p.57-64, 1996.
27. MINER, D.J.; RICE, J.R.; RIGGIN, R.M.; KISSINGER, P.T. Voltammetry of acetaminophen and its metabolites. **Analytical Chemistry**, Washington, v.53, n.14, p.2258-2263, 1981.
28. MATHUR, N.C.; GOYAL, R.N.; MALIK, W.U. Oxidation of 2-aminoquinoline at a stationary pyrolytic graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.230, p.91-96, 1990.

29. MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; VANEESORN, Y.; LIAWRUANGRATH, B. Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry. **Talanta**, London, v.58, p.1221-1234, 2002.
30. CHEVION, S.; ROBERTS, M.A.; CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v.28, n.6, p.860-860, 2000.
31. DE FARIA, D.L.A.; SANTOS, P.S. Primaquine diphosphate and its cation radical: a spectrochemical investigation. **Spectrochimica Acta**, v.47A, n.12, p.1653-1660, 1991.
32. CHYAN, Y.G.; HSIAO, M.W.; CATUARA, C.M.; LIN, C.T. Photophysical and redox properties of dibucaine and primaquine: a comparison study. **Journal of Physical Chemistry**, v.98, p.10352-10357, 1994.
33. LA-SCALEA, M.A.; CHUNG, M.C.; CRUZ, M.L.; SERRANO, S.H.P.; FERREIRA, E.I. Dissociation and electrooxidation of primaquine diphosphate as an approach to the study of anti-Chagas prodrugs mechanism of action. **Bioelectrochemistry**, v.53, p.55-59, 2000.
34. LA-SCALEA, M.A.; MENEZES, C.M.S.; MATSUTAMI, G.C.; POLLI, M.C.; SERRANO, S.H.P.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling of the voltammetric oxidation at a glassy carbon electrode of the antimalarial drug primaquine and its prodrugs succinylprimaquine and maleylprimaquine. **Electrochimica Acta**, Oxford, v.51, p.5103-5111, 2006.
35. COLOMBO, C.; VAN DEN BERG, C.M.G. Simultaneous determination of several trace metals in seawater. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.337, n.1, p.29-40, 1997.

36. BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O.; TUGULEA, L. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.322, n.3, p.151-157, 1996.
37. KLETENIK, YU. B.; ALEKSANDROVA, T.P. Submicron regeneration of the working surface of indicator electrodes: regeneration of metal electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v.52, n.7, p.680-682, 1997.
38. BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical methods - fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, 1980.
39. GORTON, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues and cells. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v.7, n.1, p.23-45, 1995.
40. PLESKOV, Y.V.; SAKHAROVA, A.Y.; KROTOVA, M.D.; BOUILOV, L.L.; SPITSYN, B.V. Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.228, n.1-2, p.19-27, 1987.
41. MORT, J.; KUHMANN, D.; MACHONKIN, M.; MORGAN, M.; JANSEN, F.; OKUMURA, K.; LEGRICE, Y.M.; NEMANICH, R.J. Boron doping of diamond thin-films. **Applied Physics Letters**, v.55, n.11, p.1121-1123, 1989.
42. SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. **Analytical Chemistry**, Washington, v.65, p.345, 1993.
43. RAMESHAM, R.; ASKEW, R.F.; ROSE, M.F.; LOO, B.H. Growth of polycrystalline diamond over glassy-carbon and graphite electrode materials. **Journal of the Electrochemical Society**, Washington, v.140, n.10, p.3018-3020, 1993.

44. SWAIN, G.M. The susceptibility to surface corrosion in acidic fluoride media: a comparison of diamond, HOPG and glassy carbon electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, Washington, v.141, n.12, p.3382-3393, 1994.
45. REUBEN, C.; GALUN, E.; COHEN, H.; TENNE, R.; KALISH, R.; MURAKI, Y.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A.; BUTLER, J.M.; LÉVY-CLÉMENT, C. Efficient reduction of nitrite and nitrate to ammonia using thin-film B-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.396, n.1-2, p.233-239, 1995.
46. BARROS, R.C.M.; RIBEIRO, M.C.; AN-SUMODJO, P.T.; JULIÃO, M.S.S.; SERRANO, S.H.P.; FERREIRA, N.G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.2, p.317-325, 2005.
47. BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry – principles, methods and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 61 e p. 131, 1993.
48. DAVIDSON, J.L. In: SPEAR, K.E.; DISMUKES, J.P.; eds. **Synthetic diamond: emerging CVD science and technology**, New York: John Wiley & Sons, cap.2, p. 356, 1994.
49. AWADA, H.; STROJEK, J.W.; SWAIN, G.M. Electrodeposition of metal adlayers on boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, Washington, v.142, n.3, p.L42-L45, 1995.
50. FERRO, S.; DE BATTISTI, A. Electrochemistry of the aqueous ceric/cerous redox couple at conductive diamond and gold electrodes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.4, n.10, p.1915-1920, 2002.

51. RAMESHAM, R. Effect of annealing and hydrogen plasma treatment on the voltammetric and impedance behavior of the diamond electrode. **Thin Solid Films**, v.315, n.1-2, p.222-228, 1998.
52. DINIZ, A.V.; FERREIRA, N.G.; CORAT, E.J.; TRAVA-AIROLDI, V.J. Efficiency study of perforated diamond electrodes for organic compounds oxidation process. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.12, n.3-7, p.577-582, 2003.
53. MARTIN, H.B.; ARGOITIA, A.; LANDAU, U.; ANDERSON, A.B.; ANGUS, J.C. Hydrogen and oxygen evolution on boron-doped diamond electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, Washington, v.143, n.6, p.L133-L136, 1996.
54. COOPER, J.B.; PANG, S.; ALBIN, S.; ZHENG, J.L.; JOHNSON, R.M. Fabrication of boron-doped CVD diamond microelectrodes. **Analytical Chemistry**, Washington, v.70, n.3, p.464-467, 1998.
55. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G.; CORAT, E.J. Electrochemical activity of boron-doped diamond electrodes grown on carbon fiber cloths. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.11, p.657-661, 2002.
56. FERREIRA, N.G.; MENDONÇA, L.L.; TRAVA-AIROLDI, V.J.; ROSOLEN, J.M. Electrochemical intercalation of lithium into boron-doped CVD diamond electrodes grown on carbon fiber cloths. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.12, n.3-7, p.596-600, 2003.
57. BARROS, R.C.M.; FERREIRA, N.G.; AZEVEDO, A.F.; CORAT, E.J.; AN-SUMODJO, P.T.; SERRANO, S.H.P. Morphological and electrochemical studies of spherical boron doped diamond electrodes. **Thin Solid Films**, Lausanne, v.513, n.1-2, p.364-368, 2006.

58. AZEVEDO, A.F.; BARROS, R.C.M.; SERRANO S.H.P.; FERREIRA, N.G. SEM and Raman analysis of boron-doped diamond coating on spherical textured substrates. **Surface & Coatings Technology**, Lausanne, v.200, n.20-21, p.5973-5977, 2006.
59. TRÖSTER, I.; FRYDA, M.; HERRMANN, D.; SCHÄFER, L.; HÄNNI, W.; PERRET, A.; BLASCHKE, M.; KRAFT, A.; STADELMANN, M. Electrochemical advanced oxidation process for water treatment using DiaChem (R) electrodes. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.11, n.3-6, p.640-645, 2002.
60. FUJIMORI, N.; IMAI, T.; DOI, A. Characterization of conducting diamond films. **Vacuum**, Oxford, v.36, n.1-3, p.99-102, 1986.
61. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G.; CORAT, E.J.; TRAVA-AIROLDI, V.J.; IHA, K. Electrochemical characterization on semiconductors p-type CVD diamond electrodes. **Brazilian Journal of Physics**, São Paulo, v.29, n.4, p.760-763, 1999.
62. JULIÃO, M.S.S.; ALMEIDA, E.C.; LA SCALEA, M.A.; FERREIRA, N.G.; COMPTON, R.G.; SERRANO, S.H.P. Voltammetric behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v.17, n.3, p.269-273, 2005.
63. RAMESHAM, R.; ROPPEL, T.; ELLIS, C.; LOO, B.H. Electrical characterization of undoped and boron-doped polycrystalline diamond thin-films. **Journal of the Electrochemical Society**, Washington, v.138, n.10, p.2981-2984, 1991.
64. RONG-BIN, L.; XIAO-JUN, H.; HE-SHENG, S.; XIAN-CHANG, H. Co-doping of diamond with boron and sulfur. **Journal of Materials Science**, Dordrecht, v.39, n.3, p.1135-1137, 2004.

65. RISTEIN, J.; RIEDEL, M.; STAMMLER, M.; MANTEL, B.F.; LEY, L. Surface conductivity of nitrogen-doped diamond. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.11, n.3-6, p.359-364, 2002.
66. GHEERAERT, E.; CASANOVA, N.; TAJANI, A.; DENEUVILLE, A.; BUSTARRET, E.; GARRIDO, J.A.; NEBEL, C.E.; STUTZMANN, M. *n*-type doping of diamond by sulfur and phosphorus. **Diamond and Related Materials**, Lausanne, v.11, n.3-6, p.289-295, 2002.
67. STERNSCHULTE, H.; SCHRECK, M.; STRITZKER, B.; BERGMAIER, A.; DOLLINGER, G. Control of lithium-*t*-butoxide addition during chemical vapour deposition of Li-doped diamond films by optical emission spectroscopy. **Physica Status Solidi A - Applied Research**, Berlin, v.174, n.1, p.65-72, 1999.
68. SIBILIA, J.P.; ed. **A guide to materials characterization and chemical analysis**. New York: VCH, 1988.
69. LATTO, M.N. **The electrochemistry of diamond**. PhD Thesis, University of Bristol, School of Chemistry, Faculty of Science; Bristol, Setembro, 2001.
70. BRITTON, H.T.S.; ROBINSON, R.A. The use of the antimony-antimonous oxide electrode in the determination of the concentration of hydrogen ions and in potentiometric titrations. The Prideaux-Ward universal buffer mixture. **Journal of Chemical Society**, v.287, p.458-473, 1931.
71. GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONNOLY, T.N.; IZAWA, S.; SINGH, R.M.M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, Washington, v.4, n.2, p.467-477, 1966.

72. TRAVA-AIROLDI, V.J.; CORAT, E.J.; LEITE, N.F.; DEL BOSCO, E.; BARANAUSKAS, V.; VALERA, M.C.; PENA, A.F.V. **Patent No.** EP811082-A, WO9626303-A, WO9626303-A1, BR9500865-A, EP811082-A1, EP811082-B1, DE69612736-E, CA2214276-C, US6511700-B1, 1998.
73. WILKE, C.R.; CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. **AICHE Journal**, Washington, v.1, n.2, p.264-270, 1955.
74. BOCKRIS, J. O'M.; REDDY, A.K.N. **Modern electrochemistry – fundamentals of electrodicts**, 2^a ed., New York: Plenum Press, 2000.
75. MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for analytical chemistry**. 2^a ed.; New York: John Wiley & Sons, p.115-117, 1988.
76. BROWN, E.R.; SANDIFER, J.R. In: ROSSITER, B.W.; HAMILTON, J.F.; eds. **Physical methods of chemistry – electrochemical methods**. Vol. II, New York: John Wiley & Sons, p.333-334, 1986.
77. BARD, A.J.; LEDWITH, A.; SHINE, H.J. Formation, properties and reactions of cation radicals in solution. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v.13, p.155-278, 1976.
78. PETEK, M.; BRUCKENSTEIN, S.; FEINBERG, B.; ADAMS, R.N. Anodic oxidation of substituted methoxyphenols. Mass spectrometric identification of methanol formed. **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v.42, p.397-401, 1973.
79. PAPOUCHADO, L.; PETRIE, G.; SHARP, J.H.; ADAMS, R.N. Anodic hydroxylation of aromatic compounds. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.90, n.20, p.5620-5621, 1968.

80. PAPOUCHADO, L.; PETRIE, G.; ADAMS R.N. Anodic oxidation pathways of phenolic compounds. Part I. Anodic hydroxylation reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.38, p.389-395, 1972.
81. YANG, Z.P.; ALAFANDY, M.; BOUTAKHRIT, K.; KAUFFMANN, J.-M.; ARCOS, J. Electrochemical oxidation of 8-hydroxyquinoline and selective determination of tin(II) at solid electrodes. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v.8, n.1, p.25-29, 1996.
82. KIM, K.-W.; KUPPUSWAMY, M.; SAVINELL, R.F. Electrochemical oxidation of benzene at a glassy carbon electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v.30, p.543-549, 2000.
83. FREMERY, M.; HÖVER, H.; SCHWARZLOSE, G. Elektrochemische Benzol-Oxidation, ein nebenproduktfreier Weg zum Hydrochinon. **Chemie Ingenieur Technik**, v.46, n.15, p.635-639, 1974.
84. HOWELL, J.O.; GONÇALVES, J.M.; AMATORE, C.; KLASINC, L.; WIGHTMAN, R.M.; KOCHI, J.K. Electron transfer from aromatic hydrocarbons and their p-complexes with metals. Comparison of the standard oxidation potentials and vertical ionization potentials. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.106, p.3968-3976, 1984.
85. NELSON, R.F. 2 electrons vs ECE in stationary electrode voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v18, n.3, p.328-329, 1968.
86. BACON, J.; ADAMS, R.N. Anodic oxidations of aromatic amines. III. Substituted anilines in aqueous media. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.90, n.24, p.6596-6599, 1968.

87. FOSSEY, J.; LEFORT, D.; SORBA, J. **Free radicals in organic chemistry**, New York: John Wiley & Sons; Paris: Masson, p.94, 1995.
88. KOCHI, J.K., ed. **Free radicals**, vol.II, New York: John Wiley & Sons, p.243, 1973.
89. POTTER, D.W.; HINSON, J.A. Mechanisms of acetaminophen oxidation to N-acetyl-P-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.262, n.3, p.966-973, 1987.
90. LUND, H.; BAIZER, M.M.; eds. **Organic electrochemistry – an introduction and a guide**. 3^a ed.; New York: Marcel Dekker, p.582-586, 1991.
91. REDDY, S.J.; KRISHNAN, V.R. Electrochemical oxidation of *o*-anisidine at a platinum electrode. **Indian Journal of Chemistry**, Bombaim, v.20A, n.7, p.729-731, 1981.
92. WEINBERG, N.L.; WEINBERG, H.R. Electrochemical oxidation of organic compounds. **Chemical Reviews**, v.68, p.449-523, 1968.
93. HAMMERICH, O.; PARKER, V.D. Kinetics and mechanisms of reactions of organic cation radicals in solution. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v.20, p.55-189, 1984.
94. DENUAULT, G.; MIRKIN, M.V.; BARD, A.J. Direct determination of diffusion coefficients by chronoamperometry at microdisk electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.308, p.27-38, 1991.
95. BAKER, J.K.; McCHESNEY, J.D.; JORGE, L.F. A simple colorimetric method for the determination of primaquine metabolites in urine. **Bulletin of the World Health Organization**, v.63, n.5, p.887-891, 1985.

96. BAKER, J.K.; McCHESNEY, J.D.; JORGE, L.F. Characterization of the urinary metabolites of primaquine in rats. **Pharmaceutical Research**, v.3, n.3, p.132-141, 1986.
97. SAAD, B.B.; ZAHID, Z.A.; RAHMAN, S.A.; AHMAD, M.N. Primaquine-selective electrodes based on macrocyclic crown ether. **Analyst**, Cambridge, v.117, n.8, p.1319-1321, 1992.
98. ENDOH, Y.S.; YOSHIMURA, H.; SASAKI, N.; ISHIHARA, Y.; SASAKI, H.; NAKAMURA, S.; INOUE, Y.; NISHIKAWA, M. High-performance liquid-chromatographic determination of pamaquine, primaquine and carboxyprimaquine in calf plasma using electrochemical detection. **Journal of Chromatography B – Biomedical Applications**, v.579, n.1, p.123-129, 1992.
99. DEAN, R.A.; OCHIENG, W.; BLACK, J.; QUEENER, S.F.; BARTLETT, M.S.; DUMAUAL, N.G. Simultaneous determination of primaquine and carboxyprimaquine in plasma using high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B – Biomedical Applications**, v.655, n.1, p.89-96, 1994.
100. BORTOCAN, R.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of primaquine and its metabolite carboxyprimaquine by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.25, p.2848-2853, 2004.
101. ARGUELHO, M.L.P.M.; ZANONI, M.V.B.; STRADIOTTO, N.R. Electrochemical oxidation and voltammetric determination of the antimalaria drug primaquine. **Analytical Letters**, v.38, p.1415-1425, 2005.

102. CVAČKA, J.; QUAISEROVÁ, V.; PARK, J.; SHOW, Y.; MUCK, JR., A.; SWAIN, G.M. Boron-doped diamond microelectrodes for use in capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, Washington, v.75, n.11, p.2678-2687, 2003.
103. XU, J.; GRANGER, M.C.; CHEN, Q.; STROJEK, J.W.; LISTER, T.E.; SWAIN, G.M. Boron-doped diamond thin-film electrodes – diamond thin films could be an electrochemist's best friend. **Analytical Chemistry**, Washington, v.69, p.591A-597A, 1997.
104. SILVA, R.P.; SERRANO, S.H.P. Electrochemical oxidation of biological molecules at carbon paste electrodes pre-treated in guanine solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Washington, v.33, p.735-744, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)