

## DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO DO PAR $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$ DERIVADO DE NITROFURAL UTILIZANDO BIOSSENSOR DE GLICOSE

*Silvia Helena Pires Serrano<sup>1</sup>*

*José Vinicius Martins<sup>2</sup>*

*Murilo Sérgio da Silva Julião<sup>3</sup>*

**RESUMO** – A ação biológica de nitrocompostos, derivados nitroimidazólicos, presentes em fármacos com propriedades antichagásicas depende da redução do grupo nitro e formação de dois intermediários de redução: o nitroradical aniônico ( $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ ) e o derivado hidroxilamínico ( $\text{RNHOH}$ ). Neste trabalho substituiu-se o  $\text{O}_2$  molecular, envolvido no ciclo enzimático da glicose oxidase, pelo nitrofural. Desta forma o  $\text{RNO}_2^{\bullet-}$  foi gerado enzimaticamente num biossensor de glicose, construído a partir da modificação de um eletrodo de ouro por monocamadas organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico. O sinal detectado na ausência da glicose em solução demonstrou que o processo de modificação superficial do eletrodo criou um ambiente hidrofóbico local, adequado à formação e detecção do radical, em meio preponderantemente aquoso e pH próximo ao fisiológico, independentemente de o ciclo enzimático estar ativo ou não.

Palavras-chave: Biossensor. Glicose. Nitroradical. Nitrofural. Voltametria cíclica.

### 1 INTRODUÇÃO

Existem vários nitroheterocíclicos com elevada atividade antichagásica, sem, contudo utilidade terapêutica, em face dos efeitos adversos graves que apresentam. Entre eles encontram-se o megazol e o

---

<sup>1</sup> Professora associada do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).  
E-mail: shps@iq.usp.br

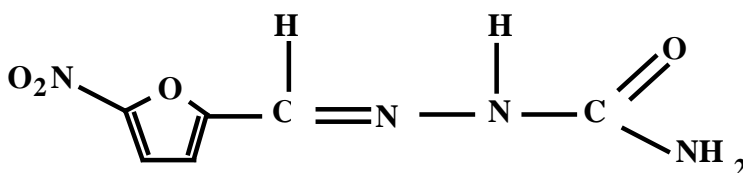
<sup>2</sup> Bacharel em Química pelo Instituto de Química da USP.

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Curso de Química da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/CE. E-mail: murilo.juliao@pq.cnpq.br

nitrofurais, anteriormente conhecido como nitrofurazona (NFZ). Outros agentes, como a primaquina, de emprego como antimalárico na terapêutica (KOROLKOVAS, 2000), a nifuroxazida e a nifuroxima (BLUMENSTIEL *et al*, 1999) também apresentaram atividade anti-chagásica.

O nitrofurais [5-nitro-2-furfurilidenossemicarbazona] foi sintetizado com base no conhecimento de que o ácido furóico, bem como seus derivados alquilados e mercuriais, apresentavam atividade bacteriostática. Tal derivado mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DODD *et al*, 1944). A estrutura do nitrofurais (NFZ) é apresentada no esquema 1.

Esquema 1 - Estrutura química do nitrofurais



Este fármaco foi empregado, inicialmente, durante a II Guerra Mundial, no tratamento de queimaduras, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (CRENSHAW *et al*, 1976). Em razão da resistência bacteriana, o espectro de atividade foi se modificando ao longo do tempo (CRENSHAW, 1976; KOROLKOVAS, 2000).

Muitas bactérias causadoras de infecções superficiais na pele ou em mucosas são sensíveis a este fármaco. Este composto apresenta atividade contra *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Aerobacter aerogens*, *Proteus* e *Trypanosomas*, inibindo um grande número de enzimas bacterianas, especialmente as envolvidas na degradação aeróbica e anaeróbica da glicose e piruvato. Apesar de inibir uma variedade de enzimas, o nitrofurais não é considerado um inibidor enzimático, sendo usualmente administrado na concentração de 0,2% em transportadores solúveis ou miscíveis em água (LEPORI, 1998). A toxicidade desse nitrofurais é alta por via oral, em razão da

hemólise e neuropatia graves que provocam. Em alguns países foi retirado do mercado e em outros continua a ser empregado apenas por via tópica, sendo de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas da pele – feridas, queimaduras e úlceras – especialmente aquelas resistentes a outros fármacos (KOROL-KOVAS, 2000).

Em 1969, Andrade e Brener observaram que este composto provocava destruição do *T. cruzi* (ANDRADE; BRENNER, 1969). Mais tarde, em 1988, Henderson *et al.* constataram a inibição da tripanotona redutase por naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural (HENDERSON *et al.*, 1988). Em 1994, Gonçalves *et al.* identificaram potencialização da atividade do nitrofural em associação com primaquina quando ensaiado em cultura de células LLC-MK2, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (GONÇALVES *et al.*, 1995).

Medicamentos contendo derivados nitroimidazóis como princípio ativo também são de grande importância para fins terapêuticos por possuírem amplo espectro de atividade contra bactérias tipo Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, helmintos, tumores hipóxicos e por selecionarem baixo nível de resistência em microorganismos anaeróbicos (LA-SCALEA, 1998). A ação biológica dos nitrocompostos ( $\text{RNO}_2$ ) depende da redução do grupo nitro, e a ação citotóxica deles tem sido atribuída a dois intermediários desta redução: o nitroradical aniônico e o derivado hidroxilamínico. Os mecanismos de ação desses compostos normalmente envolvem uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas por inibições de várias enzimas que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita (CAMPO; MORENO, 1984).

Em geral, o primeiro passo do metabolismo desses compostos é a sua redução ao correspondente ânion nitrorradical. Sob condições anaeróbicas, esse radical pode sofrer redução gerando derivado nitroso, hidroxilamina e aminoderivados (NÚÑEZ-VERGARA *et al.*, 1997). O nitrorradical aniônico e o derivado hidroxilamínico são os principais intermediários responsáveis pela ação citotóxica de alguns nitroheterocíclicos (LA-SCALEA, 1998).

Vários processos fisiológicos importantes, sempre catalisados por enzimas, são baseados em etapas de oxidação e redução, existindo evidências experimentais de que os produtos resultantes em tais reações podem ser obtidos usando-se apenas os métodos eletroquímicos. Normalmente, os pesquisadores utilizam diversos eletrodos de trabalho, tais como: gota de mercúrio, eletrodos sólidos baseados em platina, carbono vítreo ou diamante altamente dopado com boro (JULIÃO et al, 2005) para determinar o potencial redox do par  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$ , bem como o tempo de vida do radical (SQUELLA et al, 2006; SQUELLA et al, 2007), responsável pela intensidade da ação farmacológica e citotóxica, esta que muitas vezes limita o uso do composto na terapêutica.

As medições são normalmente feitas em meio misto (solvente não aquoso/tampão aquoso) ou diretamente em meio não aquoso, simulando a condição lipofílica da membrana celular. Por outro lado, no interior da célula, o meio é aquoso e este fato nos incentivou a tentar determinar o potencial redox em meio preponderantemente aquoso (JULIÃO et al, 2005). *In vivo*, a redução do nitrocomposto é promovida via enzimática, e assim, um biossensor contendo uma enzima para efetuar o reconhecimento molecular produzindo o nitrorradical aniônico simularia as condições observadas *in vivo*. Evidentemente, para tanto, a superfície do biossensor deveria ser muito mais hidrofóbica do que a superfície dos eletrodos convencionais. Esta condição é obtida utilizando monocamadas auto-organizáveis de tiois, previamente formadas sobre o eletrodo de ouro, já que as mesmas mimetizam o microambiente celular das bicamadas lipídicas (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002), o que é interessante para estabilização do radical livre formado via mecanismo enzimático.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Reagentes e soluções**

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) – Sigma Aldrich; enzima glicose oxidase

tipo II (GOx) – Sigma, EC 232-601-0 de *Aspergillus niger* 15500 unidades/g; glutaraldeído em solução aquosa a 25% (v/v) – Sigma; nitrofural (NFZ) grau analítico – Avocado e glicose – Sigma.

As soluções preparadas a partir dos reagentes citados foram: ácido 3-mercaptopropiônico  $23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em etanol; glutaraldeído a 2,5% (v/v) em água deionizada; glicose oxidase 3519 U/mL em tampão fosfato (pH = 5,1); glicose  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em água deionizada; nitrofural  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em 50% de água deionizada e 50% de etanol. A solução de glicose foi utilizada após repouso por uma noite para permitir o equilíbrio entre os isômeros, e a solução de nitrofural (NFZ) foi armazenada ao abrigo da luz para evitar degradação por fotólise.

## 2.2 Equipamentos

Todas as medidas voltamétricas foram efetuadas usando-se: um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT20 da Eco Chemie (Holanda) acoplado ao programa GPES 4.9.007; as medidas de pH foram executadas utilizando-se pHmetro e eletrodo de vidro combinado, modelos 654 e 6.0203.100 (OE), respectivamente, ambos Metrohm. Em seguida, as medidas voltamétricas foram tratadas utilizando o software Microcal Origin 5.0. Foi utilizado como eletrodo de trabalho o eletrodo de ouro comercial (Metrohm) modificado conforme procedimento descrito a seguir.

Todos os experimentos eletroquímicos foram executados em temperatura ambiente numa célula convencional de três eletrodos. Ag/AgCl,  $\text{KCl}_{\text{sat}}$  e uma espiral de platina foram usados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. O eletrodo de trabalho foi, inicialmente, polido com suspensão de diamante em suporte de vidro recoberto com feltro e lavado com água deionizada. Em seguida foi sonicado em diclorometano por 5 minutos (YANG et al, 1995).

## 2.3 Método de modificação do eletrodo

Uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  de solução  $23 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de MPA foi adicionada diretamente à superfície do eletrodo, previamente poli-

da com suspensão de diamante, efetuando-se a secagem ao ar. Em seguida, adicionou-se segunda alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da mesma solução e esperou-se nova secagem ao ar. Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  de solução de glutaraldeído 2,5% foram adicionados esperando-se a secagem. Finalmente, adicionou-se à superfície do eletrodo 10  $\mu\text{L}$  de solução enzimática 3519 U/mL e novamente o eletrodo foi seco ao ar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os voltamogramas registrados para o NFZ  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH = 8,0) com o biossensor recém-preparado e após 24 horas de hidratação em tampão fosfato (pH = 5,1). A hidratação prévia da membrana em tampão fosfato (pH = 5,1) foi imprescindível para diminuir a resistência do eletrodo e permitir a detecção das correntes faradaicas de interesse. Considerando a hidratação da camada enzimática como característica necessária ao funcionamento do biossensor, as medidas voltamétricas em solução contendo nitrofural e glicose foram realizadas após 24 horas (tempo otimizado) após construção do biossensor, período durante o qual o mesmo ficou imerso em solução tampão fosfato (pH = 5,1).

O sinal voltamétrico relativo ao par redox reversível  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$  foi detectado mesmo na ausência de glicose na célula eletroquímica, demonstrando que o biossensor mimetiza as características hidrofóbicas do microambiente celular, permitindo o registro do sinal de reoxidação do nitro radical aniônico, Figura 2. Os resultados mostram ainda, que a presença de glicose na célula eletroquímica produz um aumento nos sinais de corrente, mostrando que de fato o nitrocomposto ( $\text{RNO}_2$ ) participa do ciclo enzimático.

A Figura 3 também traz informações sobre a saturação do modelo enzimático. Como pode ser observado, após certa concentração de substrato, mesmo aumentando a concentração de NFZ, o sinal já não pode ser mais aumentado. O potencial redox do par  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$  detectado no biossensor ( $-0,46 \text{ V vs. Ag/AgCl, KCl-sat}$ ) para o nitrofural está em boa concordância com aquele registrado em eletrodo de diamante altamente dopado com boro12, à velocidade

de varredura = 100 mVs<sup>-1</sup>. De fato, a diferença de velocidade de varredura utilizada nos dois modelos não impede a comparação direta de resultados, pois em se tratando de um sistema reversível o potencial redox do sistema não se altera com a variação da velocidade de varredura, embora os sinais de corrente variem.

Figura 1 - Voltamogramas cíclicos registrados com o biossensor em solução contendo 5,0 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de NFZ em tampão BR (pH = 8,0). (1) biossensor recém-preparado; (2) biossensor após 24 horas de hidratação em tampão fosfato (pH = 5,1). Condições experimentais: (1): E<sub>i</sub> = 0,0 V, E<sub>l</sub> = -0,70 V, E<sub>f</sub> = 0,0 V,  $\nu$  = 700 mVs<sup>-1</sup> e (2): E<sub>i</sub> = 0,0 V, E<sub>l</sub> = -0,60 V, E<sub>f</sub> = 0,0 V,  $\nu$  = 700 mVs<sup>-1</sup>.

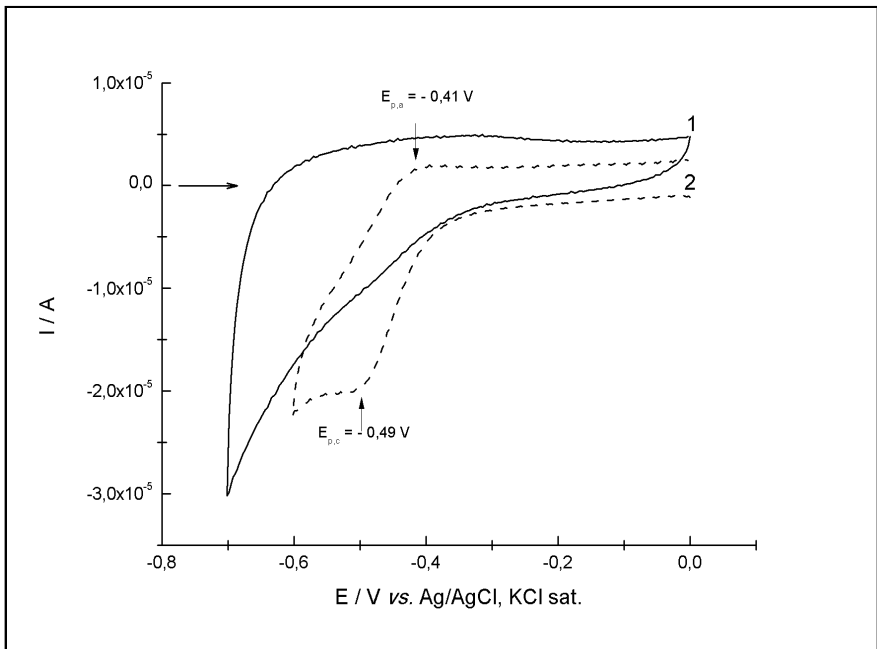


Figura 2 - Voltamogramas cíclicos registrados com o biossensor hidratado em solução contendo concentrações crescentes de NFZ e glicose em tampão BR (pH = 8,0). (1): [NFZ] =  $9,1 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e  $4,5 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de glicose; (2): [NFZ] =  $9,1 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e  $9,1 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de glicose. Condições experimentais:  $E_i = -0,30$  V,  $E_\lambda = -0,60$  V,  $E_f = -0,30$  V,  $\nu = 700$  mVs<sup>-1</sup>. Solução na célula previamente desaeerada por borbulhamento de N<sub>2</sub> durante 15 minutos.

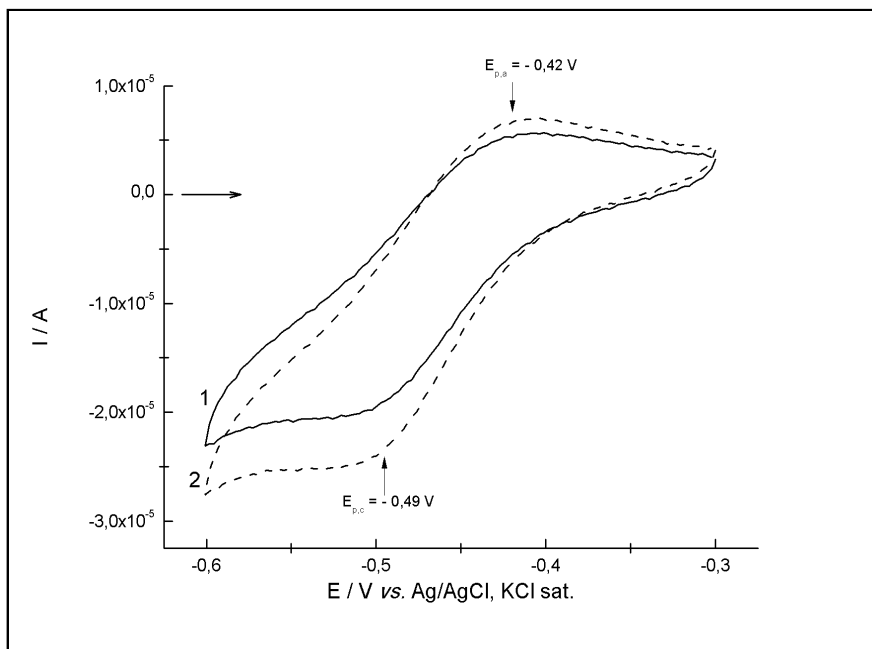
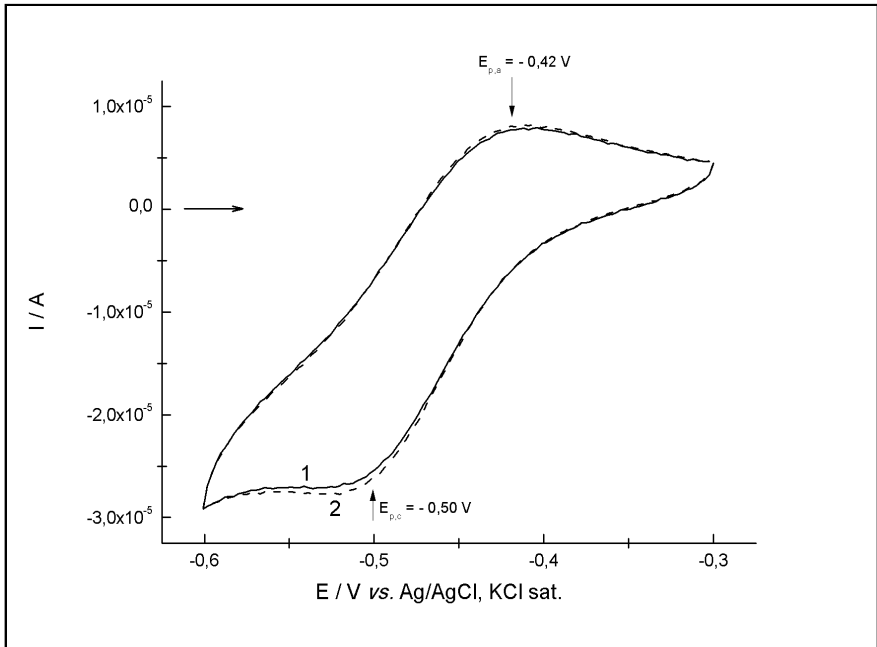




Figura 3 - Voltamogramas cíclicos registrados com o biossensor hidratado em solução contendo concentrações crescentes de nitrofural (NFZ) e glicose em tampão BR (pH = 8,0). (1): [NFZ] =  $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de glicose; (2): [NFZ] =  $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de glicose. Condições experimentais:  $E_i = -0,30 \text{ V}$ ,  $E_\lambda = -0,60 \text{ V}$ ,  $E_f = -0,30 \text{ V}$ ,  $\nu = 700 \text{ mV s}^{-1}$ . Solução da célula previamente desaerada por borbulhamento de  $\text{N}_2$  durante 15 min.



#### 4 CONCLUSÕES

O biossensor construído permitiu a determinação do potencial de redução, em meio preponderantemente aquoso, do par  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet -}$  usado como composto modelo. O mesmo procedimento pode ser aplicado na determinação do potencial de redução de

outros nitroderivados, pois a metodologia desenvolvida utiliza um biossensor cuja superfície se assemelha ao meio biológico encontrado *in vivo*, dispensando, portanto, a necessidade de se efetuarem medições em meio misto ou não aquoso.

DETERMINATION OF THE  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\bullet-}$  PAIR REDUCTION  
POTENTIAL DERIVED OF THE NITROFURAL USING  
GLUCOSE BIOSENSOR

*ABSTRACT – The biological action of nitrocompounds presents on drugs with antichagasic properties depends on the reduction of the group nitro and formation of two intermediary of reduction: anionic nitroradical ( $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ ) and the hydroxilaminic derivative. In this work,  $\text{O}_2$  molecular, involved on enzymatic cycle of the glucose oxidase, was replaced by nitrofural. Thus the  $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ , was generated enzymatically on a biosensor of glucose, built from the modification of a gold electrode by self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid. The signal detected in the absence of glucose in solution, demonstrated that the process of superficial modification of the electrode created a local hydrophobic environmental, adequate to the formation and detection of radical, in aqueous highly medium and pH near to physiologic pH, regardless of the enzymatic cycle to be or not be active.*

*Keywords: Biosensor. Glucose. Nitroradical. Nitrofural. Cyclic voltammetry.*

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os apoios financeiros concedidos pela FAPESP (Processos: 2001/01192-3 e 2006/00763-0) e pela FUNCAP, por meio do Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa e Estímulo à Interiorização (Processo BPI-0202-1.06/2008). O estudante José Vinícius Martins agradece à bolsa concedida pela FAPESP.

### REFERÊNCIAS

ANDRADE, Z. A.; BRENNER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do

*Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, p. 222-228, 1969.

BLUMENSTIEL, K. *et al.* Nitrofurán drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 11, p. 1791–1799, 1999.

CAMPO, R. do; MORENO, S. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells *T. cruzi*. **Reviews of Infections and Diseases**, v. 6, p. 233-238, 1984.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, 2002.

CRENSHAW, C. A *et al.* Nitrofurazone therapy in “middle burns”: a review. **Current Therapeutic Research-Clinical Experimental**, v.19, p.487–492, 1976.

DODD, M. C. *et al.* The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, n.1, p. 11–18, 1944.

GONÇALVES, M. T. *et al.* Ação da associação da primaquina e nitrofurazona em células LLC-MK2 com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, supl.1, Res. 328, p. 164, 1994.

HENDERSON, G. B. *et al.* “Subversive” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

## *Ciênc. Exatas e da Terra/Química*

JULIÃO, M. S. S. *et al.* Voltammetric behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 3, p. 269-274, 2005.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, 2000/2001, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento Voltamétrico e Mecanismos de Ação Biológica de Nitroimidazóis. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 59-75, 1998.

LEPORI, L.R. (Org.) **P. R. Vade-Mecum**. 4. ed., São Paulo: Soriak, p. 337, 1998.

NÚÑEZ-VERGARA, L. J. *et al.* Nitro radical anion formation from nifurtimox. Biological evidences in *Trypanosoma cruzi*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 151-155, 1997.

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

SQUELLA, J. A. *at al.* Electrochemical reduction of 2-nitroimidazole in aqueous mixed medium. **Journal of American Chemical Society**, v. 154, n. 4, p. F77-F81, 2007.

YANG, Z. *et al.* Analytical application of self-assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, p. 789-795, 1995.