

# Orbital

JULY-SEPTEMBER, 2014  
VOLUME 6, NUMBER 3  
ISSN 1984-6428

The Electronic Journal of Chemistry

*Theoretical Semi-empirical Study of the  
Glycine Molecule Interaction with  
Fullerene C60*

Published by the  
Institute of Chemistry of the Federal  
University of Mato Grosso do Sul  
Campo Grande, Brazil

[www.orbital.ufms.br](http://www.orbital.ufms.br)

# Orbital - Vol. 6 No. 3 - July-September 2014

## Table of Contents

### FULL PAPERS

<a href="#"><u>Síntese, Caracterização e Atividade Biológica do Acetato de Cu(II) para Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) e Bactérias <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Listeria monocytogenes</i></u></a>	
<i>Jéssica V. Nardeli, Cláudio Teodoro de Carvalho, Eduardo José de Arruda, Paulo Cesar Cavalcante Vila Nova, Lincoln Carlos Silva de Oliveira, Andréa Haruko Arakaki</i>	122-129
<a href="#"><u>Stability-Indicating RP-UPLC Method for the Simultaneous Determination of Potential Degradation and Process Impurities of Amlodipine Basylate and Benazepril HCl in Pharmaceutical Dosage Form</u></a>	
<i>Gajanan B. Kasawar, Mazahar Farooqui</i>	130-141
<a href="#"><u>A Descrição Matemática do Desempenho Eletroanalítico de Nanopartículas de Óxido de Cobre(II) na Eletrodeteccção de Hidrazina</u></a>	
<i>Volodymyr Valentynovych Tkach, Reza Ojani, Vasyi Vasylyovych Nechyporuk, Petro Ivanovych Yagodynets</i>	142-146
<a href="#"><u>Oxidação do Ciclopirox em Eletrodo de Diamante: Estudo do Comportamento Voltamétrico e Determinação Eletroanalítica</u></a>	
<i>Michely Cristina Gardenal Santos, Camila Farinha Valezi, Jessica Scremin, Elen Romão Sartori</i>	147-155
<a href="#"><u>Theoretical Semi-empirical Study of the Glycine Molecule Interaction with Fullerene C60</u></a>	
<i>Mohanned J. Al-Anber</i>	156-160
<a href="#"><u>Electroanalytical Determination of Danofloxacin in Biological Samples Using Square Wave Voltammetry</u></a>	
<i>Chirley Vanessa Boone, Magno Aparecido Gonçalves Trindade, Claudio Teodoro de Carvalho, Adriana Evaristo de Carvalho</i>	161-168
<a href="#"><u>Lipase production by <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 on soybean meal supplemented with amino acids, and some physicochemical properties of the enzyme</u></a>	
<i>Milena Martins Andrade, Aneli de Melo Barbosa, Robert F.H Dekker, Maria Inês Rezende, Josana Maria Messias, Luiz Henrique Dall'antonia</i>	169-177
<a href="#"><u>Synthesis, Modification and Antimicrobial Activity of Carbon Nanotube Matrix</u></a>	
<i>E. Sudha, R. Selvam, P. Sivaswaroop, K. P. Subhash Chandran</i>	178-183
<a href="#"><u>Synthesis of 4-Triazolylamino- and 4-Benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-Benzopyran-2-ones and their Antimicrobial Activity</u></a>	
<i>Ramiz Hoti, Aferdita Nura-Lama, Gjyle Mulliqi-Osmani, Naser Troni, Fatbardh Gashi, Hamit Ismaili, Veprim Thaci</i>	184-190

### SHORT COMMUNICATIONS

<a href="#"><u>A Simple, Proficient and Green Approach for the Synthesis of 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes Catalyzed by Cerium(IV) Ammonium Nitrate in Aqueous Media</u></a>	
<i>Shitole Nana Vikram, Nana V. Shitole, Gopal K. Kakde</i>	191-194



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

## Síntese, Caracterização e Atividade Biológica do Acetato de Cu(II) para Larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e Bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Lysteria monocytogenes*

Jéssica Verger Nardeli<sup>a\*</sup>, Eduardo José de Arruda<sup>a</sup>, Cláudio Teodoro de Carvalho<sup>a</sup>, Paulo César C. Vila Nova<sup>b</sup>, Isaias Cabrini<sup>a</sup>, Andréa Haruko Arakaki<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD, 79.804-970, Dourados, MS, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79.074-460, Campo Grande, MS, Brasil.

Article history: Received: 19 February 2014; revised: 23 July 2014; accepted: 24 July 2014. Available online: 07 August 2014.

**Abstract:** The objective of this work was the synthesis of Cu(II) acetate route carbonate for analysis of biological activity in larvae 3rd instar of *Aedes aegypti* (Rockefeller strain) and bacteria gram-negative and gram-positive. The characterization the sample commercial and synthesized via carbonate was accomplished by FTIR and indicated the formation of Cu(II) acetate by the bands 1425-1625  $\text{cm}^{-1}$ . Analyses by UV-Vis showed bands at 244 nm attributed to acetate and 704 nm to the Cu(II). The melting point for commercial sample and route carbonate was 117 °C. The results of the bioassays for toxicity of Cu(II) acetate  $\text{CL}_{10}$  showed 14.48;  $\text{CL}_{50}$   $\text{CL}_{90}$  22.81 and 50.00  $\text{mg L}^{-1}$ . The antibiograms showed bactericidal activity for grams and concentration-dependent in the range of  $10^{-1}$  to  $10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$ . The values of the inhibition zones for bacteria found were 16 to 10 mm of Cu(II) acetate. Results demonstrated significant biological activity for of Cu(II) acetate and the need for continuing studies for investigation of Cu(II) acetate as an alternative to the comprehensive control of immature in breeding, micro / food chain and even the attractiveness of insects females for breeding.

**Keywords:** larvae; dengue; acetate; bactericide

### 1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica, extensão territorial e assimetrias de desenvolvimento regional e infraestrutura do Brasil proporcionam peculiaridades regionais e oferecem condições para a reprodução, disseminação e persistência de vetores e continuidade das doenças negligenciadas. No Brasil, a dengue é a doença de maior incidência. A identificação de focos, medidas de controle/manejo, nem sempre foram (são) realizados de modo preventivo no verão e/ou períodos quentes e chuvosos, há atrasos na tomada de decisão, não há análise prévia da resistência das populações aos inseticidas, atrasos na disponibilização de recursos e implementação do manejo e falta de adesão da população. Apesar da preocupação, as infestações e doença repetem-se de modo periódico, agravada e com mortalidade da população, principalmente, velhos e crianças [1].

A dengue é um sério problema da saúde pública no mundo (WHO, 1981; VILCHES, T. N.; FERREIRA, C. P. 2013). A doença é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) para a viabilização dos ovos e continuidade da reprodução. O mosquito possui hábitos domésticos, vive no perímetro de domicílios, tem hábitos diurnos e alimentam-se de sangue humano e néctar, sobretudo ao amanhecer e ao entardecer [1, 2]. A elevada densidade populacional do *Aedes aegypti*, a sua capacidade vetorial e a incidência periódica da doença, às vezes, de forma epidêmica fazem com que a estratégia básica de controle seja ainda a aplicação intensiva de inseticidas sintéticos como o principal meio de controle populacional do inseto. Entretanto, o sucesso do controle esbarra na capacidade adaptabilidade dos insetos, mutação do vírus e até reprodução dos insetos em condições consideradas adversas [1, 3].

\*Corresponding author. E-mail: [jeh.nardeli@gmail.com](mailto:jeh.nardeli@gmail.com)

A prevenção primária da doença considera a redução populacional do *A. aegypti* por uso de inseticidas convencionais como Temephós, Malathion e outros. Entretanto, a resistência adquirida pelo inseto reduz a eficiência do inseticida no controle químico, exigindo concentrações de controle cada vez maiores para a eliminação do inseto adulto e com sérios impactos ambientais [4].

O acetato de Cu(II) possui fórmula  $\text{Cu}_2(\text{OAc})_4$ , coloração verde escuro e  $\text{Cu}_2(\text{OAc})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  é verde-azulado. O composto possui uso abrangente como inseticida/fungicida, oxidante até catalisador, além usos na síntese orgânica. O método de síntese é clássico, utilizando sulfato de cobre, amônia e ácido acético (2:4:4) em com aquecimento para produzir o produto dihidratado [5].

O íon metálico Cu(II) é tóxico para larvas de *A. Aegypti* [6, 7] nos estágios de ovo e larval, inviabiliza a eclosão dos ovos e retarda o ciclo reprodutivo do inseto, além de constituir-se como micronutriente para o solo, plantas, microrganismos e animais [8].

O trabalho é parte do desenvolvimento de novos inseticidas multifuncionais que possuam ação abrangente para vários sítios de toxicidade sistema digestório (SD), enzimático (SE) e sistema nervoso central (SNC) e/ou periférico (SNP) para exercício da toxicidade e retardo do processo de adaptação do inseto, resistência ou susceptibilidade aos inseticidas. Busca-se, desse modo, prolongar a efetividade do uso dos inseticidas e desenvolver estratégias e/ou mecanismos para a liberação lenta nos criadouros para o controle populacional de imaturos do inseto, ovos e larvas, que é considerada a estratégia mais racional de controle de insetos vetores e redução da incidência da doença. Esta pesquisa teve por objetivo a síntese de acetato de Cu(II) para a avaliação da atividade inseticida para larvas de 3º estágio de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) e atividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A atividade biológica do acetato de cobre é importante para avaliação da biodegradabilidade, além do estudo da molécula do ácido acético e o íon metálico por serem molécula e metal disponível para uso como intermediário químico e abrangente, devido a atividade contra fungos e bactérias. Estes compostos são relativamente simples, e podem compor um arsenal de produtos para utilização no controle doméstico de insetos vetores e ajudar na adesão do controle do vetor pela população. A maioria dos

criadouros estão nas residências e sua manutenção envolvem hábitos como a rega de plantas e disponibilidade de água nos recipientes que são apontados como potenciais criadouros desses insetos. A disponibilidade de um produto com baixa toxicidade pode constituir-se num ponto importante com relação a adesão da população aos programas de manejo/controlado governamental de vetores.

### Funções biológicas do Cu(II)

A importância biológica do Cu(II) é relatada pela importância do elemento para atividades metabólica e biológica. O Cu(II) é um micronutriente essencial e encontrados em pequena quantidade no organismo com atividade catalítica e vital, possuindo estreita faixa de toxicidade [9, 10].

O cobre ocorre no solo como Cu(II) e sua concentração é baixa de 2 a 100 mg kg<sup>-1</sup> (ppm). A fixação ocorre por sorção e/ou adsorção no solo particulado [11]. A principal causa da carência de Cu(II) no solo e água pode estar relacionado aos elevados conteúdos de ferro disponível no solo e água [12, 13]. O íon Cu(II) e/ou o metal Cu são possíveis no solo sob condições de redução na presença de enxofre e halogênios [13, 14].

O Cu(II) participa da composição das enzimas citocromo oxidase (no transporte de elétrons na respiração aeróbica; lisil oxidase (na catalise e formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina (na absorção e transporte de ferro na síntese de hemoglobina); superóxido dismutase (proteção das células dos efeitos tóxicos de espécies do oxigênio) entre outras [15, 16].

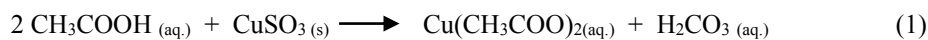
## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Síntese do acetato de Cu(II) via carbonato

A via carbonato para a síntese foi escolhida pela pureza do produto final [17]. Na síntese do acetato de Cu(II) foram utilizados carbonato de Cu(II) como precursor. O carbonato de Cu(II) foi obtido por solubilização de sulfato de cobre penta-hidratado (VETEC/Sigma-Aldrich) com adição da suspensão de hidrogenocarbonato de sódio (VETEC/Sigma-Aldrich), seguido de aquecimento. O precipitado de carbonato de Cu(II) foi filtrado em papel de filtro Whatman 40 e lavados a exaustão com água destilada gelada até o teste negativo com BaCl<sub>2</sub> para o íon sulfato.

O acetato de Cu(II) foi sintetizado por adição estequiométrica de ácido acético sobre a suspensão do carbonato de Cu(II) até total dissolução, seguido de aquecimento a 65 °C para eliminação total do dióxido de carbono. A solução foi evaporada em Banho-Maria e o sólido acondicionado em frascos de vidro e

mantidos em dessecador, sob vácuo, contendo sílica para caracterizações. As reações são mostradas nas equações de 1, a síntese, e na equação 2, a evaporação da água por aquecimento indireto em banho termostático para formar o produto diidratado.



### Caracterização do acetato de Cu(II)

#### *Espectroscopia de Infravermelho - FT-IR*

As medidas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (FTIR) foi realizada por Espectrômetro Jasco®, modelo FT-IR-4100, utilizando-se pastilhas de KBr.

#### *Ponto de fusão - PF*

O ponto de fusão foi determinado em equipamento da marca Instrutherm® com faixa de aquecimento de 30 °C a 200 °C.

#### *Análise gravimétrica - AG*

A análise gravimétrica foi realizada em forno mufla QUIMIS®. Após atingir a temperatura de 600 °C numa razão de aquecimento de 9 °C min<sup>-1</sup>, deixou-se por 30 minutos para conversão total da amostra a óxido para análise e cálculos.

#### *UV-Vis.*

A espectrofotometria no UV-Vis. foi realizada em espectrofotômetro Varian®, modelo Cary 50, com varredura de 200 nm a 800 nm utilizando solução diluída em etanol PA (VETEC®) nas respectivas concentrações de acetato de cobre 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### Bioensaios de toxicidade

Os bioensaios de toxicidade foram realizados com larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. Os ovos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller (susceptível) foram fornecidos por IBEX/Entomologia/LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ - Rio de Janeiro-RJ e IB-UNICAMP – Campinas-SP. A incubação dos ovos, eclosão e obtenção das larvas de 3º estágio *A. aegypti* para os experimentos de toxicidade foi realizada em estufa BOD (TECNAL®). A alimentação das larvas foi realizada com ração de

peixe (Sera Koi® profissional *Spirulina* - alimento de peixes), e mantida da eclosão até o 3º estágio larval para a realização dos bioensaios de toxicidade. Os controles negativo e positivo utilizados foram dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% e Temephós Pestanal (Fluka®) - 31526 a 1 ppm, respectivamente.

Os experimentos de toxicidade foram realizados com a metodologia da Organização Mundial da Saúde/World Health Organization [3] com modificações. Para eclosão os ovos de *Ae. aegypti* foram imersos em recipiente com água isenta de cloro sob condições controladas de temperatura (T = 27 ± 2°C), umidade relativa (UR = 70 ± 5%). Após a eclosão as larvas foram colocadas em forma plástica e alimentadas com ração de peixe na razão de 1 grama da ração por litro de solução com as larvas) e, após alcançarem o 3º estágio de desenvolvimento foram utilizadas para os bioensaios de toxicidade [18].

O acetato de Cu(II) foi pesado, dissolvido em DMSO a 0,5% sob banho em ultrassom, para uma concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> (1000 ppm). Posteriormente, esta solução foi diluída para concentrações de 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 50 ppm, 25 ppm e 10 ppm por adição de DMSO a 0,5% em 10 mL por copo plástico, à temperatura ambiente. Nos experimentos foram utilizados, para cada ensaio de toxicidade, sete concentrações inicialmente de 10 a 500 ppm, e depois repetido com 10 concentrações de 100 a 10 ppm, em quadruplicata para cada concentração utilizada com controle positivo (Temephos a 1 ppm) e negativo (DMSO 0,5%). Grupos de dez (10) larvas de terceiro estágio foram separados e transferidos para copos plásticos com 10 mL de solução de acetato Cu(II) em DMSO a 0,5%. Após 24 horas de exposição das larvas às soluções de acetato a 27 ± 2 °C foram registrados o número de larvas mortas e/ou larvas sem resposta ao estímulo mecânico. Para a análise dos dados e obtenção das CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, foi utilizada a análise por Probit

[19]. Os experimentos foram repetidos por três vezes em dias diferentes. Os experimentos foram sempre acompanhados, em cada repetição, dos controles positivo e negativo.

Os antibiogramas foram realizados para análise da atividade inibitória do acetato de Cu(II) frente as bactérias *gram-positivas* (+) e *gram-negativas* (-) por disco de difusão utilizando acetato de Cu(II) nas concentrações de  $10^{-1}$  (18.154 mg L<sup>-1</sup> equivalente a uma colher de sopa) a  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (18,154) para *Escherichia coli* ATCC-25922 (-), *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 (+), *Salmonella typhimurium* ATCC-14028 (-) e *Lysteria monocytogenes* ATCC-7644 (+). Os halos de inibição de antibióticos padrões para bactérias gram-positivas e gram-negativas (penicilina e estreptomicina) foram realizados. Os halos de inibição de acetato de Cu(II) e antibióticos padrões foram utilizados para avaliar a ação inibitória do acetato Cu(II).

Os antibiogramas por ensaio de disco de difusão por metodologia proposta por Kirby-Bauer [20]. Os antibiogramas foram realizados por espalhamento com 100 µL da cultura bacteriana por alça de Drigalski esterilizada em placa de Petri com Ágar de Mueller-Hinton. No centro da placa de Petri depositou-se um disco de papel de filtro impregnado com soluções de acetato de Cu(II) e antibióticos, separadamente. As bactérias utilizadas foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton por 24 horas a 37 °C em estufa BOD. A inoculação foi realizada com uso de inóculo com densidade óptica de 1,0 a 600 nm. Os discos de papel filtro autoclavado de 6 mm foram impregnados com concentrações de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de acetato de Cu(II). Os discos de papel impregnados

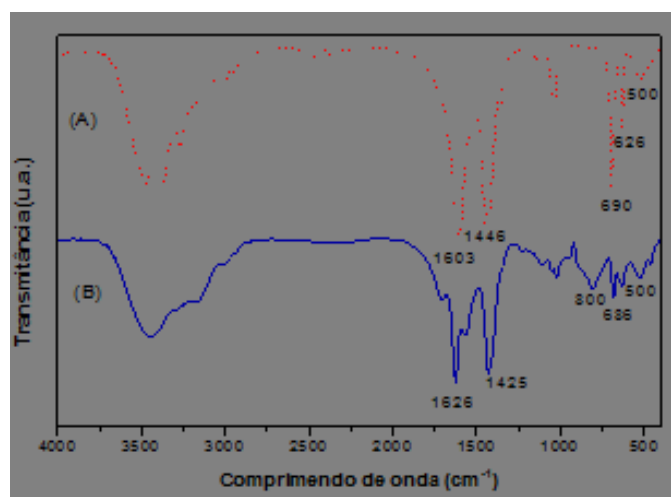
foram colocados com pinça sob a superfície do meio de cultura no centro da placa de Petri. A placa de Petri foi incubada a 28 °C por 48 horas, para leitura dos halos de inibição. A formação do halo de inibição ao redor do disco impregnado indica a região de inibição que não ocorreu crescimento bacteriano. As análises foram realizadas em quadruplicata para cada concentração.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acetato de cobre(II) foi sintetizado via carbonato e caracterizado com elevada pureza (98%) por técnicas clássicas e instrumentais: espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de absorção molecular e análise gravimétrica e atividades inseticida e bactericida.

#### Caracterização dos compostos

A Figura 1A e 1B mostram os espectros de FTIR dos acetatos de cobre (II) (VETEC/Sigma-Aldrich) e sintetizado via carbonato, respectivamente. Nos espectros pode-se observar a sobreposição em 500 cm<sup>-1</sup> do estiramento metal-ligante [21]. Na região de 700-800 cm<sup>-1</sup>, observam-se no espectro (1A) em 626-690 cm<sup>-1</sup> e (1B) em 686-800 cm<sup>-1</sup> duas bandas características de dobramento do C-H [22]. A ligação de Cu(II)-carboxilato pode ser encontrada no estiramento simétrico e assimétrico na região de 1450 a 1570 cm<sup>-1</sup> [23]. As bandas dos acetatos de Cu(II) comercial e sintetizado via carbonato podem ser observadas nos espectros (1A) entre 1446 e 1603 cm<sup>-1</sup> e em 1425 e 1626 cm<sup>-1</sup> (1B).



**Figura 1.** Espectro de FTIR de amostras de acetato comercial de Cu(II) Vetec/Sigma-Aldrich PA (A) e acetato de Cu(II) sintetizado via carbonato (B).

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis. do acetato de Cu(II) foram obtidos. Os testes qualitativos foram realizados para análise dos acetatos de Cu(II) e correlação com FTIR. As bandas dos espectros em 244 nm e 703 nm para acetato de Cu(II) VETEC/Sigma-Aldrich e em 250 nm e 704 nm para o acetato de Cu(II) sintetizado via carbonato sugerem a formação do produto. Nestes espectros foram utilizados cortes de escala para diferentes concentrações de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e  $2.10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> utilizadas. Podem-se observar no espectro duas bandas de absorção, uma banda com máximo em 244 nm ( $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e outra a 703 nm ( $2.10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). As bandas são atribuídas ao íon acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) e íon Cu(II), respectivamente. Estes valores concordam com valores da literatura [24, 25]. A concentração foi aumentada por um fator de 20 vezes para observação da banda característica do íon Cu(II) [24]. O espectro do acetato de Cu(II) sintetizado via carbonato foi realizado em diferentes concentrações de  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. As duas bandas de absorção em 250 nm ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e 704 nm ( $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>), são

atribuídas à transferência de carga do ligante (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) para o metal e do íon cobre Cu(II), característica de transições d-d [21].

Os resultados de FTIR e espectros UV-Vis. confirmaram a formação do acetato de Cu(II) via carbonato, e as bandas características são comparadas aos valores da literatura [21].

A análise gravimétrica foi realizada e análise dos óxidos resíduos tratados para cálculo da pureza. Os resultados dos experimentos são mostrados na Tabela 1.

Os valores obtidos por análise gravimétrica confirmam a pureza dos acetatos de cobre e pode-se afirmar a pureza e formação do acetato de Cu(II) via carbonato, devido à concordância dos cálculos gravimétricos. Os valores dos pontos de fusão (P.F) para o acetato de Cu(II) VETEC/Sigma-Aldrich e sintetizado via carbonato foram de 117 °C, em concordância com o valor apresentado pelo Merck Index®/12ª edição.

**Tabela 1.** Valores obtidos por análise gravimétrica para os acetatos metálicos.

	Massa teórica óxido (g)	Massa experimental óxido (g)	Pureza (%)
Acetato de Cu(II) (comercial)	0,2027	0,2010	99,16
Acetato de Cu(II) (via carbonato)	0,2200	0,2142	98,36

#### Testes de toxicidade e atividade bactericida

As análises da toxicidade foram realizadas com larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. Os valores encontrados mostram para o acetato de Cu(II) atividade larvicida. Os resultados dos bioensaios de

toxicidade expressos em concentração letal para uma população de larvas - CL (CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) foram expressos por concentração-resposta após tratados por análise de Probit. O resultado de toxicidade do acetato de Cu(II) e do inseticida organofosforado Temephós para linhagem Rockefeller são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de Concentrações Letais (CLs) dos bioensaios de toxicidade e intervalo de toxicidade para larvas de 3º estágio de *A. aegypti* (Rockefeller) com acetato de Cu(II) e Temephós.

CLs	CL <sub>10</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	CL <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	CL <sub>90</sub> (mg l <sup>-1</sup> )
Acetato de Cu(II)	14,48 (9,56-18,12)	26,91 (22,81-30,31)	50,00 (43,18-63,92)
Temephós	0,0101 ± 0,00123	0,0166 ± 0,00181	0,0250 ± 0,00290

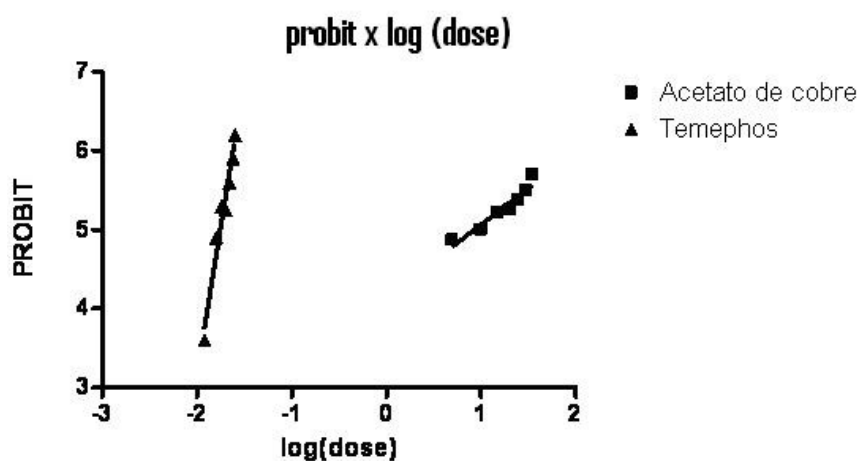
O gráfico de mortalidade em Log-probit (Figura 2) para a linhagem susceptível (Rockefeller) expõe a relação entre as concentrações letais (CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) utilizadas para o sal metálico e o

inseticida Temephós. A análise gráfica mostra que quanto mais distante (à direita) da curva de Rockefeller, maior o nível de tolerância do inseto ao inseticida (menor a toxicidade da substância). A CL<sub>50</sub>

para a população susceptível está no intervalo de 22,81 a 30,31 mg L<sup>-1</sup> de acetato de Cu(II). Pode-se, assim, concluir que o acetato de Cu(II) possui atividade inseticida, mas também é um micronutriente essencial, reabsorvido por microrganismos, plantas e humanos. Para os humanos a quantidade recomendada do metal pode variar de 6 a 10 ppm [26].

Na Tabela 2, observa-se que o acetato de Cu(II) para comparação das CL<sub>50</sub> é 500 vezes menos potente que o Temephós para a linhagem susceptível Rockefeller. Em termos de aparente concentração o

Temephós é um inseticida mais eficiente que o acetato de Cu(II) para larvas suscetíveis (Rockefeller). Entretanto, os insetos urbanos já adquiriram resistência ao Temephós e o controle químico de Temephós utiliza concentrações operacionais de até 1000 mg L<sup>-1</sup> ou maior. Neste cenário, pode-se propor uma nova comparação e o acetato de Cu(II) que torna-se 100 vezes mais ativo que o Temephós e pode causar menor impacto ambiental devido a biodegradabilidade e reciclagem dos nutrientes por plantas.



**Figura 2.** Curva Rockfeller para comparação de toxicidade do acetato de Cu(II) via carbonato e Temephós (inseticida organofosforado) para larvas de 3º estágio de *A. aegypti*.

O antibiograma permite analisar a resistência da bactéria a antibióticos. Esta informação permite traçar estratégias para o controle de imaturos de *A. aegypti*, pela imposição de condições desfavoráveis ao inseto durante a reprodução. O inseticida pode realizar uma ação primária inseticida e secundária por atuar sobre as condições física e química do ambiente aquático, de forma abrangente, sobre a cadeia alimentar e/ou impor condições desfavoráveis aos insetos por pH e voláteis. As larvas de *A. aegypti* necessitam de material orgânico e microrganismos como fonte nutritiva (bactérias, fungos e protozoários) que são indispensáveis para a reprodução, desenvolvimento e sinalização química através de voláteis para atração da fêmea e oviposição. Pode-se, assim, propor o acetato de Cu(II) como inseticida e bactericida e/ou interferente na reprodução e cadeia alimentar do *A. aegypti*.

Os gráficos na Figura 3 mostram os valores de diâmetros dos halos de inibição (ausência de crescimento bacteriano) obtidos nos antibiogramas realizados com acetato de Cu(II) com bactérias gram-

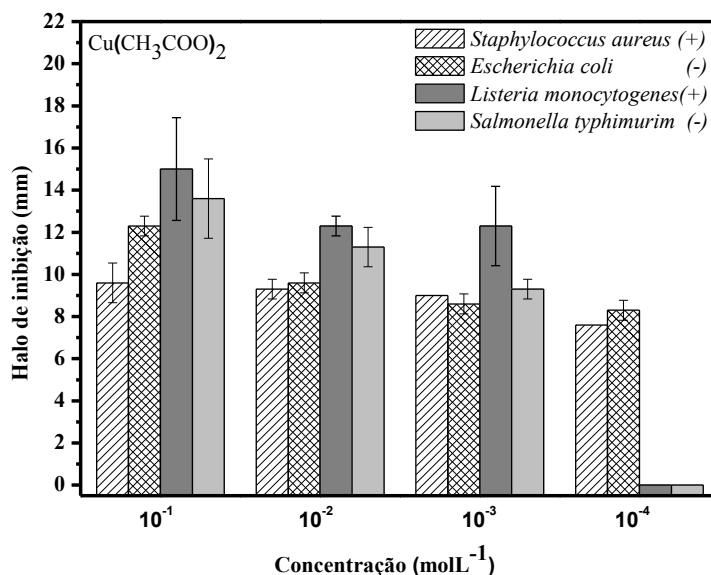
positivas e gram-negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923(+), *Escherichia coli* ATCC-25922(-), *Listeria monocytogenes* ATCC-7644(+), e *Salmonella typhimurium* ATCC-14028(-)).

Os resultados experimentais por halo de inibição mostraram a atividade bactericida do acetato de Cu(II) mesmo com diluições sucessivas. Pode-se perceber que sob diluição da ordem de 10x, ocorre a redução do efeito inibitório para o acetato de Cu(II). Apesar de o acetato manter-se ativo nas diluições sucessivas a atividade é dependente da concentração. Este resultado sugere que a solubilidade do acetato e a saturação do ambiente nos criadouros podem ser utilizadas para a manutenção da atividade tóxica dos inseticidas por um período de controle prolongado ou por alguns ciclos de reprodução.

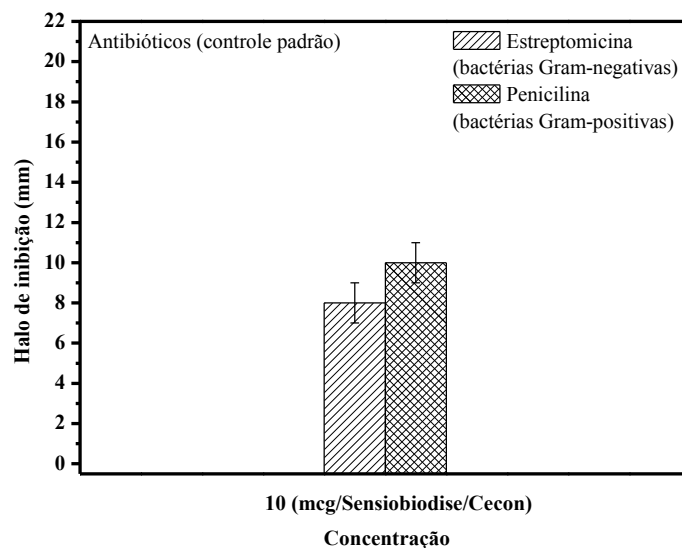
Na Figura 4, ilustram-se a concentração dos antibióticos comerciais utilizados como controle padrão. O antibiótico Estreptomina possui atividade para bactérias gram-negativas e a Penicilina para bactérias gram-positivas. Pode-se notar maior inibição para os acetatos em relação aos antibióticos, quando



se compara o halo de inibição.



**Figura 3.** Antibiogramas para bactérias *gram-positivas* e *gram-negativas* com para o acetato de Cu(II). Halos de inibição em mm.



**Figura 4.** Concentração dos antibióticos padrões (controle) *versus* halo de inibição (mm) com desvio padrão  $\pm$  1,0 mm.

O ciclo sazonal do inseto transmissor da dengue, que ocorre, principalmente, nos períodos chuvosos e quentes do ano [1], permite a utilização alternativa de substâncias de fácil degradação, menor toxicidade e menor impacto para o meio ambiente. O custo das substâncias e facilidade de síntese dos compostos, além da baixa toxicidade, fitoabsorção e uso em espaços domésticos de potenciais criadouros

(vasos, plantas, e outros), e que permita a adesão da comunidade podem ser atrativos de incorporação dessas substâncias ao arsenal de opções de controle químico, principalmente, para a distribuição doméstica e utilizada para regar plantas e atuar como inseticida, bactericida/fungicida e adubo foliar/controlar pragas vegetais, para redução de criadouros domésticos e adesão da população ao

controle do vetor.

#### 4. CONCLUSÃO

A síntese do acetato de Cu(II) foi realizada por via carbonato com pureza de 98%, as caracterizações realizadas por análise de FTIR que indicaram a formação do acetato de Cu(II) com bandas características equivalentes à literatura. As análises de UV-Vis. indicaram a banda em 704 nm atribuída ao íon Cu(II).

Os resultados da atividade biológica do acetato de Cu(II) diidratado, uma molécula simples, de baixo custo que permite a sugestão de uso como larvicida de reduzido impacto, nas concentrações recomendadas, com fitoabsorção para o controle biológico de larvas de *A. aegypti* e microrganismos dos criadouros.

O acetato de Cu(II) possui atividade abrangente, primária inseticida e secundária sobre o inseto na reprodução/desenvolvimento e na cadeia alimentar do impondo alteração das condições físico-químicas e biológica dos criadouros. Os resultados dos antibiogramas mostraram o potencial do acetato de Cu(II) na inibição do crescimento de bactérias gram-positiva e gram-negativa em comparação aos antibióticos padrões Estreptomicina e Penicilina em termos de halo de inibição, sugerindo eficiência frente aos antibióticos padrões. A atividade inseticida e antibiótica podem inviabilizar ovos, matar e/ou reduzir a sobrevivência das larvas, alterar o microbioma dos criadouros, contaminar a matéria orgânica/alterar a cadeia alimentar e impor condições desfavoráveis nos criadouros em termos de pH e/ou até reduzir a emissão de voláteis/semioquímicos ou interferir para redução da atratividade das fêmeas aos criadouros.

#### 5. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Vilches, T. N.; Ferreira, C.P. TEMA (São Carlos) 2013, 14, 290.
- [2] Gonçalves-Neto, V. S.; Rebelo, J. M. M. *Cad. Saúde Pública* 2004, 20, 2002. [\[CrossRef\]](#)
- [3] WHO - World Health Organization. WHO-VBC 1981, 807, 6.
- [4] Villela, E. F.; Almeida, M. A. de. *Saude Soc.* 2013, 22, 137. [\[CrossRef\]](#)
- [5] Parish, E. J.; Kizito, S. A. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* 2001. [\[CrossRef\]](#)
- [6] Rayms-Keller, A.; Oison, K. E.; McGam, M.; Oray, C.; Carlson, J. O.; Beaty, B.J. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1998, 39, 41. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Arruda, E. J.; Rossi, A. P. L.; Porto, K. R. A.; Oliveira, L. C. S. de; Arakaki, A. H.; Scheidt, G. N.; Roel, A. R. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2011, 54, 509. [\[CrossRef\]](#)
- [8] Malavolta, E. São Paulo: Produquímica 1994, 153.
- [9] Ortolani, E. L. In: Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L.; Bernardi, M. M. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan S.A. 2002, 651.
- [10] Silva, M. R. L.; Canteri, M. G.; Leite Jr, R. P. *Trop. plant pathol.* 2012, 37, 75. [\[CrossRef\]](#)
- [11] Ferreira, M. E.; Cruz, M. C. P.; Raij, B. V.; Abreu, C. A. Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal: Funep. 2001, 150.
- [12] Marques, A.P.; Riet-Correa, F.; Soares, M. P.; Ortolani, E.L.; Giuliadori, M.J. *Pesq. Vet. Bras.* 2003, 23, 32. [\[CrossRef\]](#)
- [13] Prado, E. P.; Raetano, C. G.; Aguiar Júnior, H. O.; Dal Pogetto, M. H. F. do A.; Christovam, R. S.; Gimenes, M. J.; Araújo, D. *Summa phytopathol.* 2010, 36, 50. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Sodr e, F. F.; Lenzi, E. *Quim. Nova* 2001, 24, 330. [\[CrossRef\]](#)
- [15] Babior, B. M.; Kipnes, R. S.; Curnutte, J. T. *Journal Clinical Investigation* 1973, 52, 744. [\[CrossRef\]](#)
- [16] McDowell, L. R. San Diego: Academic Press 1992. 524.
- [17] Carvalho, C. T. Dissertação de Mestrado em Química, UNESP/Araraquara-SP 2006, 57.
- [18] Gadelha, D. P.; Toda, A. T. *Ver. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 1985, 37, 36.
- [19] Finney, D. University Press, Cambridge 1974, 55.
- [20] Laborclin. Manual para Antibiograma – Difusão em disco (Kirby & Bauer) 2011.
- [21] Jasiewicz, B.; Warzajtis, B.; Rychlewska, U. *Polyhedron* 2011, 30, 2015. [\[CrossRef\]](#)
- [22] Wr blewski, J. T.; Long, G. J. *Inorg. Chem.* 1977, 16, 704. [\[CrossRef\]](#)
- [23] Deacon, G. B.; Philips, R. J. *Chemistry Department, Monash University, Clayton* 1980, 3168.
- [24] De Carli, L.; Rosso, N. D.; Schnitzler, E.; Carneiro, P. I. B.; *Ci nc. Tecnol. Aliment.* 2006, 26, 1. [\[CrossRef\]](#)
- [25] Conklin, M. H.; Hoffmann, M. R. *Environ. Sci. Technol.* 1988, 22, 883. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- [26] Spitzner, R. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2001, 64. [\[CrossRef\]](#)

## Stability-Indicating RP-UPLC Method for the Simultaneous Determination of Potential Degradation and Process Impurities of Amlodipine Basylate and Benazepril HCl in Pharmaceutical Dosage Form

Gajanan B. Kasawar, Mazahar N. Farooqui\*

Post Graduate and Research Centre, Dr. Rafiq Zakaria Campus, Maulana Azad College, Rouza Bagh, Pin code: 431001, Aurangabad, India.

Article history: Received: 24 February 2012; revised: 16 July 2014; accepted: 18 July 2014. Available online: 19 September 2013.

**Abstract:** A stability-indicating RP-UPLC method was developed for the quantification of related impurities of amlodipine basylate (AB) and Benazepril hydrochloride (BH) in solid pharmaceutical dosages form. The chromatographic separation employs a C18 column using a gradient elution, being solvent-A (1.36 g of potassium dihydrogen phosphate dissolved in one liter of water, adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid) and solvent-B (acetonitrile) delivered at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The analytes were detected and quantified at 217 nm and 240 nm using photo diode-array detector. The method was validated demonstrating to be accurate and precise within the corresponding linear range of all components. The stability of the method was investigated under different stress conditions including hydrolytic, oxidative, exposed to photolytic, humidity and thermal as recommended by ICH guidelines. Relevant degradation was found under hydrolytic and oxidative conditions. Robustness against small modification in mobile phase pH, column oven temperature, flow rate and percentage of the mobile phase composition was ascertained. Lower limit of quantification and detection was also determined. The peak purity indices (purity angle < purity threshold) obtained with the aid of PDA detector and satisfactory resolution between related impurities established the specificity of the determination.

**Keywords:** amlodipine; benazepril; related substance; RP-UPLC; stability-indicating method; validation

### 1. INTRODUCTION

High blood pressure can be treated with number of drugs depending upon the causes which are responsible for it. It is increasingly appreciated that the elusive goal of a normal blood pressure is achieved only if multi-drug therapy is employed [1].

Amlodipine, 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridine dicarboxylic acid- 3-ethyl-5-methyl ester, a calcium-channel blocker, is used alone or with benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, to treat hypertension, chronic stable angina pectoris, and Prinzmetal's variant angina [2].

Benazepril, 2-[(3S)-3-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl]amino]-2-oxo-4,5-dihydro-3H-1-benzazepin-1-yl]acetic acid is an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, is a prodrug

which, when hydrolyzed by esterases to its active Benazeprilat, is used to treat hypertension and heart failure, to reduce proteinuria and renal disease in patients with nephropathies, and to prevent stroke, myocardial infarction, and cardiac death in high-risk patients [3].

AB and BH are official in USP 32 as individual monographs [4]. Detailed literature survey for AB revealed that several analytical methods are reported for the determination of amlodipine and atorvastatine by HPLC [5-7], amlodipine and atenolol by HPLC [8] and by HPTLC [9], amlodipine and metoprolol by HPLC [10-11] and amlodipine alone by HPLC [12-16], HPTLC [17], LC-MS [18-25], GC [26], amperometric detection [27-29] spectrophotometric detection [30-31], fluorescence detection [32-33], by voltammetry [34-35], and derivatization methods [36]. Similarly, literature survey for BH revealed that few techniques have

\*Corresponding author. E-mail: [mazahar\\_64@rediffmail.com](mailto:mazahar_64@rediffmail.com)

been reported for the determination of benazepril hydrochloride alone by HPLC [37-39], HPTLC [40], CE [41-43] GC-MS [44-45], LC-MS [46-47], spectrophotometric detection [48-49] and by voltammetry [50] from pharmaceutical dosages form. Few methods have been reported for the simultaneous determination of AB and BH which describes the RP-HPLC procedure [51] and the other describes an HPTLC procedure [52]. Our previous work was reported for the simultaneous determination of AB and BH using UPLC [53]. Few workers reported for the determination of the related substance of AB by HPLC [54] and BH by spectrophotometric methods [55] as individual articles.

So far, to our present knowledge, the simultaneous determination of related substances of AB and BH in solid pharmaceutical dosages form using UPLC is not reported in any journal or pharmacopeia. Hence we focused on developing a rapid, sensitive and cost-effective method using this advanced technique.

However the thorough literature survey revealed that none of the most recognized pharmacopoeias or any journals includes these drugs in combination for the simultaneous determination of related substances of AB and BH and the information regarding the stability of the drugs is not available. So it is felt essential to develop a liquid chromatographic procedure which will serves a reliable, accurate, sensitive, rapid and stability-indicating RP-UPLC method for the simultaneous determination of related substances of AB and BH in AB+BH capsule.

Regulatory agencies recommend the use of stability-indicating methods [56] (SIMs) for the analysis of stable samples [57]. This requires stress studies in order to generate the potential related impurities under stressed conditions, method development, and validation [58]. With the evident of the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [59], requirements for the establishment of SIMs have become more clearly mandated.

Environmental conditions including light, heat, and the susceptibility of the drug product towards hydrolysis or oxidation can play an important role in the production of potential impurities. Stress-testing can help identifying degradation products and provide important information about intrinsic stability of the drug product [60].

Therefore, herein we report the results of stability study of AB and BH with the aim of

determining the extent of the influence of different stress conditions on the stability of drug product.

This manuscript describes the development and subsequent validation of a screening method to simultaneously quantify the related substances of AB and BH by ultra-performance liquid chromatography (UPLC).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Reagents and materials

AB and BH active pharmaceutical ingredient (API) working standard, and related substances of AB were procured from Zhejiang Huahai pharmaceutical Co. Limited, Xunqiao, Linhai, Zhejiang, China. Test sample (2.5 mg of AB and 10 mg of BH per capsule) were procured from Market.

Chemical names for all components were listed in Table 1 and chemical structures for all components were shown in Figure 1. Potassium dihydrogen orthophosphate, orthophosphoric acid and acetonitrile were obtained from Merck limited, Mumbai, India. High purity deionized water was obtained from Millipore, Milli-Q (Bedford, MA, USA) purification system.

### 2.2. Instrumentation

UPLC system (Waters Milford, USA) equipped with inbuilt auto sampler and binary gradient pump with an on-line degasser was used. The column compartment having temperature control and photodiode array detector (PDA) was employed throughout analysis. Chromatographic data was acquired using Empower software.

### 2.3. Chromatographic Conditions

Acquity UPLC, BEH C18 (100 x 2.1) mm, 1.7  $\mu$ m (Waters Milford, USA) column was used as stationary phase maintained at 40 °C. The mobile phase involve a variable composition of solvent A (1.36 g of potassium dihydrogen phosphate dissolved in 1000 mL of water, adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid) and solvent B (acetonitrile). The mobile phase was pumped through the column at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> (Table 2).

The optimum wavelength of 240 nm and 217 nm, which represents the wavelength of maximum

response for all components, was selected in order to permit simultaneous determination of related impurities of AB and BH in AB + BH capsules. The stressed samples were analyzed using a PDA detector covering the range of 200-400 nm.

## 2.4. Solution preparation

### 2.4.1. Solvent mixture

Mix 8 parts of solvent-A and 2 parts of solvent-B.

### 2.4.2. System suitability solution

Solution containing a mixture of 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AB (equivalent to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amlodipine), 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of BH working standard and 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of benazepril impurity-3 was prepared in solvent mixture.

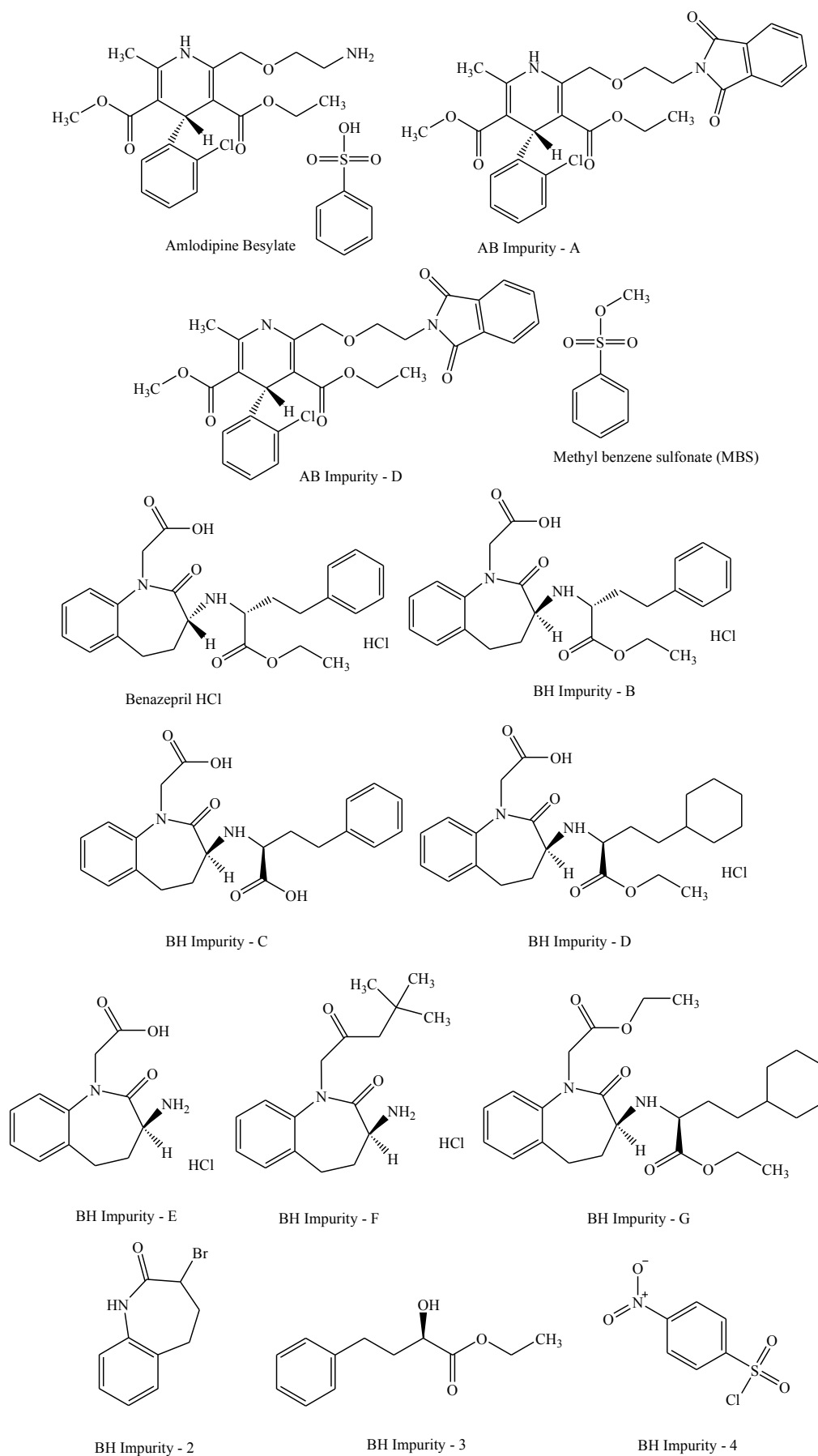
### 2.4.3. Standard solution

Solution containing a mixture of 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AB (equivalent to 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amlodipine) and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of BH working standard was prepared in solvent mixture.

**Table 1.** Chemical names of all related impurities of AB and BH.

Compounds	Chemical name	Source*
<b>[A] Amlodipine basylate and its impurities</b>		
AB	2-[(2-Aminoethoxy) methyl]-4-(2-chlorophenyl) -1, 4-dihydro-6-methyl -3, 5-pyridine dicarboxylic acid- 3-ethyl 5-methyl ester	-
Imp A	3-Ethyl 5-methyl (4RS)-4-(2-chlorophenyl)-2-[[2-(1, 3-dioxo-1, 3-dihydro-2H-isoindol-2-yl) ethoxy] Methyl]-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxylate	P
Imp D	3-Ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy) methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6 methyl pyridine-3, 5-dicarboxylate.	P
MBS	Methyl benzene sulfonate	D
<b>[B] Benazepril hydrochloride and its impurities</b>		
BH	2-[(3S)-3-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl]amino]-2-oxo-4,5-dihydro-3H-1-benzazepin-1-yl]acetic acid	-
Imp B	(3-(1-Ethoxycarbonyl-3-phenyl-(1R)-propyl) amino-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepine)-1-acetic acid monohydrochloride	P
Imp C	3-(1-Carboxy-3-phenyl-(1S)-propyl)amino-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-H-1-(3S)-benzazepine) -1-acetic acid (Benazeprilate)	D
Imp D	(3-(1-Ethoxycarbonyl-3-cyclohexyl-(1S)-propyl) amino-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepine)-1-acetic acid monohydro-chloride (Benazepril cyclohexyl)	P
Imp E	3-amino-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepine)-1-acetic acid monohydrochloride	P
Imp F	t-Butyl-3-amino-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepine)-1-acetic acid monohydrochloride	SM
Imp G	3-(1-Ethoxycarbonyl-3phenyl-(1S)-propyl) amino-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepine)-1-acetic acid ethyl ester (Benazepril ester)	P
Imp 2	3-Bromo-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S) benzazepine-2-one	P
Imp 3	Ethyl (2R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate	SM
Imp 4	4-Nitrobenzene sulfonyl chloride	SM

\*P – Process impurity, D – Degradation impurity, SM – Starting material



**Figure 1.** Chemical structure of Benazepril HCl and its related impurities.

**Table 2.** Mobile phase program for gradient elution.

Time (min)	Flow (mL/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0.000	0.30	95	5
2.780	0.30	80	20
6.950	0.30	75	25
11.120	0.30	75	25
22.230	0.30	60	40
30.000	0.30	40	60
35.000	0.30	40	60
37.000	0.30	95	5
40.000	0.30	95	5

#### 2.4.3.1. Sample solution

Solution containing a mixture of 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AB (equivalent to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amlodipine) and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of BH working standard was prepared in solvent mixture.

#### 2.4.3.2. Forced degradation sample solution for specificity study

Multiple-stressed samples were prepared as indicated below. They were chromatographed along with a non-stressed sample solution.

#### 2.4.3.3. Hydrolytic conditions: Acid, base and water-induced degradation

Test solution containing a mixture of 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AB (equivalent to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amlodipine) and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of BH were treated with 1N HCl, 1N NaOH and water, respectively. These were subjected to the condition mentioned in Table-4. The solutions were neutralized as needed (1N NaOH or 1N HCl).

#### 2.4.3.4. Oxidative condition: Hydrogen peroxide-induced degradation

Test solution containing a mixture of 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AB (equivalent to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amlodipine) and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of BH were treated with 30 % w/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  in dark under the condition shown in Table 4.

#### 2.5.3.5. Dry heat degradation study

The powdered sample was spread in a flat-bottomed plate to give a homogeneous layer (<5 mm thick) and subjected to oven under the conditions indicated in Table-4.

#### 2.4.3.6. Photolytic degradation study, Exposed to artificial light

As per guidelines for photo stability testing of new drug substances and products, samples should be exposed to light providing an overall illumination of not less than 1.2 million lux hours and an integrated near ultraviolet energy of not less than 200 watt hours (square meter)<sup>-1</sup> to allow direct comparisons to be made between the drug substance and drug product [61]. The powdered sample was spread in a flat-bottomed quartz vessel to give a homogeneous layer (<5 mm thick) and subjected a sun test chamber and exposed to forced irradiation (at 15 cm from the source) in a sun test chamber fitted with xenon lamp. Sun test meets the ID65 spectral criterion with an optical filter system consisting of a coated quartz glass dish, a window glass filter, and an ID-65 filter used in combination. The sun test's filtered xenon light source is a full spectrum light source containing both visible and UV outputs with a UV cut-on of approximately 320 nm and a spectral distribution corresponding to ID65 per ISO 10977. The sample was exposed with 250 watts  $\text{m}^{-2}$  for about 22 hours which meets the total exposure of 1.2 million lux hours. (Between 320 nm and 800 nm)

#### 2.4.3.7. Relative humidity degradation study

The powdered sample was spread in a flat-bottomed plate to give a homogeneous layer (<5 mm thick) and subjected to humidity chamber under the conditions indicated in Table-4.

Simultaneously the common placebo (mixture of all excipients without both drugs), placebo with only AB and placebo with only BH were treated same way as sample treated above in each conditions separately. All these stressed sample and placebo treated under all above stressed conditions were analyzed periodically by UPLC for the appearance of additional impurities and the impurities were identified on the basis of respective placebos and are calculated against the respective main drug component.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimization of chromatographic conditions

The possible impurities of AB and BH are very similar to respective drug substances. It is clear from the molecular structures (Fig. 1) that related compounds of AB and BH are acidic and basic in nature. To obtain a good resolution among the impurities and main drug substances we tested different stationary phases considering;

- The feature of stationary phase (RP-C<sub>8</sub> and RP-C<sub>18</sub>).
- The particle size of the column (1.7 μm and 2.1 μm).

Considering that AB, BH and their related compounds are a mixture of acidic and basic in nature, we tested following mobile phases with gradient elution,

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1.36 g L<sup>-1</sup>) as a buffer (pH 2.5, 3, 3.5, 6.5) combination with acetonitrile.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1.36 g L<sup>-1</sup>) as a buffer (pH 3) combination with methanol.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1.36 g L<sup>-1</sup>) and octanesulfonic acid sodium salt (1 g L<sup>-1</sup>) as a buffer (pH 3) combination with acetonitrile.
- (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.15 g L<sup>-1</sup>) as a buffer (pH 3, 3.5) combination with acetonitrile.
- 0.1% orthophosphoric acid as a buffer combination with acetonitrile.
- 0.1% triethylamine adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid.

#### 3.2. Selection of stationary phase

It is clear from the molecular structure (Fig. 1) that the compounds have polar and non-polar environment. Hence we started the development activity with C<sub>8</sub>-stationary phase of various manufacturers using different mobile phase. Most of the compounds are polar in nature hence the peak shape for polar compounds shows more tailing. Due to the more tailing, the poor resolutions among the peaks were found. To improve the resolution among the peaks and peak shape, the C<sub>18</sub>-stationary phase was used. Now the peak shape and resolution among the peaks were improved with Acquity BEH C<sub>18</sub>, 100 x 2.1 mm, 1.7 μm. However, the stationary phase is not only the parameter which gives better separation

among all impurities. Mobile phase, pH, and organic modifiers play a very important role which leads to the best separation.

#### 3.3. Influence of organic modifier

Different organic modifiers were tried (acetonitrile, methanol, and tetrahydrofuran) for the better chromatographic separation. With methanol, no satisfactory separation was achieved while with tetrahydrofuran the baseline drift was high hence the response for impurities was reduced. Acetonitrile was found to be better for sensitivity and separation. Hence acetonitrile was selected as an organic phase.

##### 3.3.1. Influence of pH of mobile phase buffer

The molecular structure of all components (Fig. 1) implies that few of the compounds possess carboxylic acid and few possess amine functional groups which can readily be ionized under acidic or basic mobile phases. Under acidic mobile phase the acidic components show the drastic change in retention time. Different mobile phase pH ranging from 2.5 to 6.5 was studied. The influence of pH was studied by running the spike sample with all known components with mobile phase pH 2.5 and 3.5. With pH 2.5 the resolution between benazepril impurity-E and benazepril impurity-4 and between amlodipine and benazepril impurity-B was poor whereas in pH 3.5 these resolution were improved with resolution more than 2.0 but at the same time the resolution between Benazepril and benazepril impurity-3 is poor and amlodipine peak is closely eluting with benazepril impurity-3. Hence the middle pH i.e. pH 3.0 was selected. The best separation was achieved with pH 3.0.

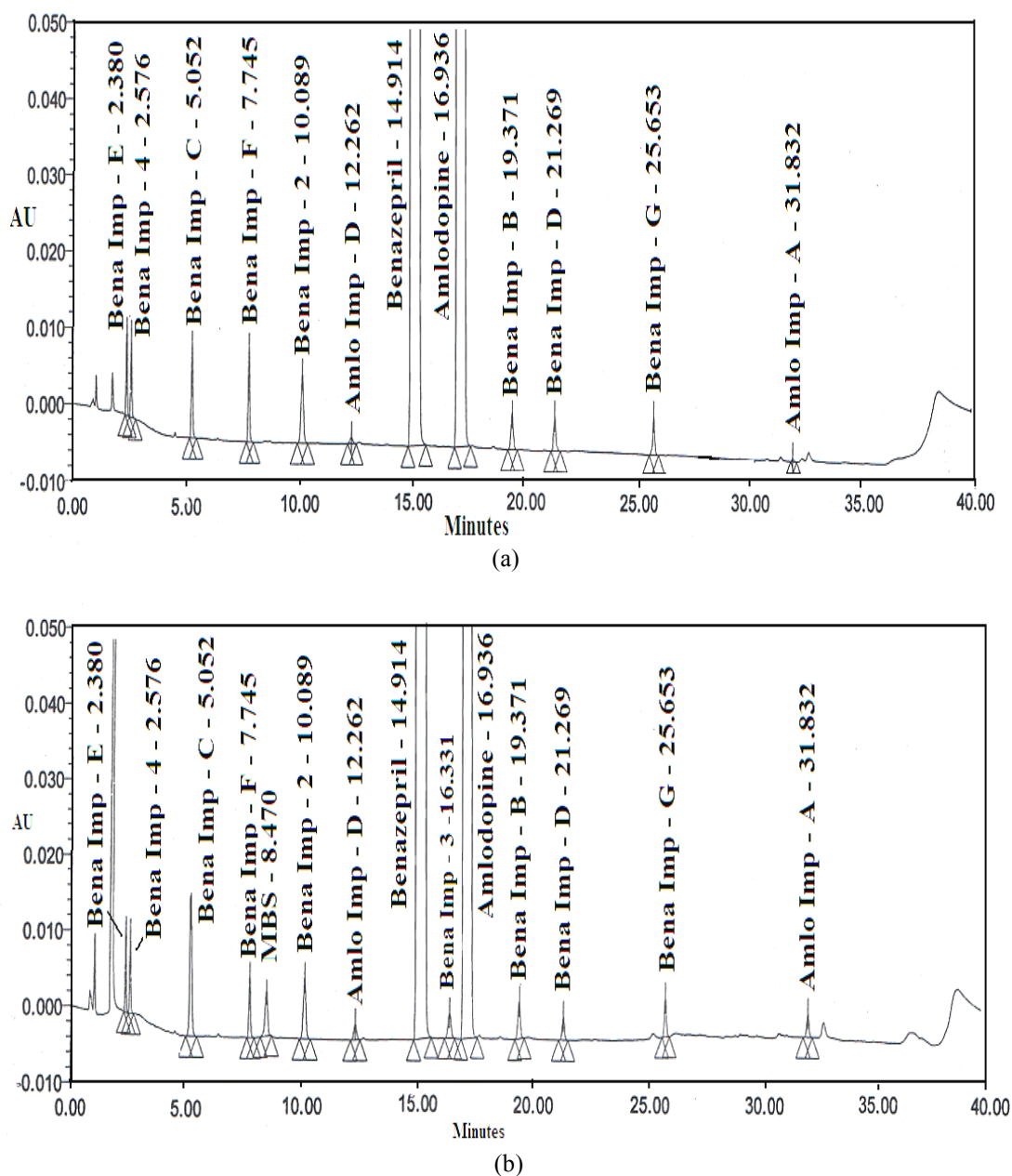
##### 3.3.2. Selection of detection wavelength

The UV spectrum in mobile phase exhibits a relative absorption maximum at 240 nm for benazepril hydrochloride, benazepril impurity-E, benazepril impurity-4, benazepril impurity-C, benazepril impurity-F, benazepril impurity-2, benazepril impurity-B, benazepril impurity-D and benazepril impurity-G while at 217 nm for methyl benzenesulfonate, amlodipine impurity-D benazepril impurity-3 and amlodipine impurity-A. Hence these wavelengths i.e. 240 nm and 217 nm were selected for the better sensitivity of the method.



After an extensive study, the method has been finalized on Acquite BEH C<sub>18</sub>, 100 x 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m using variable composition of solvent A: 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in water, adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid and solvent B: acetonitrile as mobile phase (Table-1). The mobile phase was pumped through the column at the flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and column compartment temperature was kept

at 40 °C. The detector response was found maximum at 217 nm and 240 nm; hence the typical chromatogram was recorded at both wavelengths. The typical UPLC chromatogram of sample spiked with all known impurities scanned at 217 nm and 240 nm represent the satisfactory separation of all components among each other (Fig 3).



**Figure 3.** Typical UPLC chromatogram of sample spiked with known impurities of AB and BH at (a) 240 nm, (b) 217nm.

### 3.3.3. Method validation

The optimized RP-UPLC method was

validated according to ICH guidelines [62], with respect to specificity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), linearity,

range and robustness. System suitability features were also assessed.

### 3.3.4. System suitability test

The system suitability test was performed according to USP 30 [63] and BP 2007 [64] indications. The observed RSD values at 1% level of analyte concentration were well within the usually accepted values ( $\leq 2\%$ ). Theoretical plates, USP tailing factor ( $T_f$ ), and USP resolution ( $R_s$ ) between amlodipine and benazepril impurity-3 were also determined.

### 3.3.5. Specificity

The peak purity indices of the analytes in stressed sample solutions determined with PDA detector [65-67] under optimized chromatographic

conditions, were found to be better (purity angle  $<$  purity threshold) indicating that no additional peaks were co-eluting with the analytes and evidencing the ability of the method to assess unequivocally the analyte of interest in the presence of potential interference. Baseline resolution was achieved for all investigated compounds. The FDA guidelines indicated that well separated peaks, with resolution,  $R_s > 2$  between the peak of interest and the closest eluting peak, are reliable for the quantification [68]. All the peaks meet this specification. It was observed that in acid, base, water hydrolysis, and peroxide treatment the benazepril impurity C and methyl benzene sulfonate were formed as a major degradation impurity and few unknown impurities indicating that the drug product is sensitive to acid, base, water hydrolysis, and peroxide. The degradation and the results are tabulated in Table 3.

**Table 3.** Hydrolytic, oxidizing thermal and photolytic stress conditions.

	Conditions	Time	Temperature (°C)	% Degradation	
				AB	BH
Acidic	1.0 N HCl	20 min	80	1.13	20.59
Basic	1.0 N NaOH	10 min		Stable	6.35
Hydrolytic	H <sub>2</sub> O	60 min	80	Stable	5.36
Oxidation	30% w/v H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 min	80	1.56	4.95
Thermal		12 h	105	Stable	1.34
Photolytic	250 watt h m <sup>-2</sup>	22 h		Stable	1.03
Humidity	40 °C / 75% RH	12 h		Stable	1.15

The stability of drugs in analytical solution was checked by preparing sample solution as per method and injected at regular time intervals in the proposed method at room temperature. We verified the formation of additional peaks and found that no additional peaks were formed till 25 hours indicating that the sample solution is stable for about 25 hours.

### 3.3.6. Linearity and range

The nominal concentration of test solutions for AB and BH were 0.25 mg mL<sup>-1</sup> and 1 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. Taking into account that typical impurity tolerance level currently is 0.2 % and response function was determined by preparing standard solution of each component at different concentration levels ranging from lower limit of quantification to 120 % of impurity tolerance level and that identification of impurities below lower level of quantification is not considered to be necessary unless

the potential impurities are expected to be unusually potent to be toxic.

The plots of area under the curve (AUC) of the peak responses of the analytes against their corresponding concentrations, they fit straight lines responding to equations. The y-intercepts were close to zero with their confidence intervals containing the origin. The correlation coefficients ( $r$ ) exceeded 0.98, the acceptance threshold suggested for linearity of procedures for the determination of impurity content in bulk drug [69]. Furthermore the plot of residuals exhibited random patterns with the residuals passing the normal distribution test ( $p < 0.05$ ), all of which evidenced that the method is linear in the tested range. The regression statistics are shown in Table 4.

### 3.3.7. Determination of limit of quantification and detection (LOQ and LOD)

The linearity performed above was used for the

determination of limit of quantification and detection. Residual standard deviation ( $\sigma$ ) method was applied and were predicted the values for LOQ and LOD using following formula (a), (b) and established the precision at these predicted levels. The results are tabulated in Table-4.

$$\text{LOQ} = 10\sigma / S \quad (\text{a})$$

$$\text{LOD} = 3.3\sigma / S \quad (\text{b})$$

Where  $\sigma$  = Standard deviation of response  
 S = Slope of the calibration curve

**Table 4.** Regression statistics and limit of quantification, detection.

Analyte	Conc	Regression equation	Multiple R	t-Stat	P-value	Lower	Upper	LOQ	LOD
	$\mu\text{g mL}^{-1}$					Confidence interval		$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
<b>[A] Amlodipine basylate and its impurities</b>									
AB	0.101-3.016	$y=14190x + 25$	0.99993	448	2.03E-32	14142	14277	0.095	0.031
MBS*	0.020-0.604	$y=6701x - 7$	0.99992	365	5.94E-22	6633	6715	0.010	0.003
Imp D	0.039-0.590	$y=14800x + 8$	0.99989	343	1.64E-23	14711	14901	0.032	0.011
Imp A	0.031-0.614	$y=12508x - 11$	0.99993	433	1.25E-24	12406	12533	0.028	0.009
<b>[B] Benazepril hydrochloride and its impurities</b>									
BH	0.411-12.318	$y=7679x - 61$	0.99991	439	4.51E-34	7621	7695	0.323	0.107
Imp E	0.082-2.467	$y=4930x - 3$	0.99992	383	6.93E-26	4896	4952	0.084	0.028
Imp 4	0.084-0.2524	$y=3266x - 21$	0.99993	367	7.79E-24	3234	3273	0.071	0.024
Imp C	0.081-2.419	$y=4916x + 31$	0.99993	430	1.69E-26	4918	4968	0.049	0.016
Imp F	0.078-2.347	$y=5325x - 20$	0.99994	425	1.93E-26	5281	5335	0.071	0.024
Imp 2	0.085-2.557	$y=6718x + 10$	0.99991	381	1.05E-27	6684	6760	0.061	0.020
Imp 3	0.159-2.380	$y=2630x - 8$	0.99984	303	6.21E-23	2603	2641	0.140	0.046
Imp B	0.084-2.524	$y=2959x + 10$	0.99998	668	1.06E-26	2953	2973	0.050	0.016
Imp D	0.168-2.524	$y=2640x + 25$	0.99978	269	2.33E-22	2639	2682	0.136	0.045
Imp G	0.165-2.476	$y=2090x + 2$	0.99999	2437	3.32E-30	2090	2094	0.017	0.006

\* MBS – Methyl benzene sulfonate, LOQ - limit of quantification, LOD - limit of detection.

### 3.3.8. Accuracy

Accuracy was evaluated by the simultaneous determination of the analytes in solution prepared by standard addition method. The experiment was carried out by adding known amount of each related impurities corresponding to three concentration levels of 40 %, 100 % and 150 % of the specification level in sample solution. The samples were prepared in triplicate at each level. The quantification of added analyte (% weight/weight) was carried out by using an external standard of corresponding main drug prepared at the analytical concentration and scanned at both the wavelengths of 240 nm and 217 nm. The experimental results revealed that approximate 95 - 105 % recoveries were obtained for all the investigated related compounds. Therefore, based on the recovery data (Table 5) the estimation of related compounds that are prescribed in this report has been demonstrated to be accurate for intended purpose and

is adequate for routine analysis.

### 3.3.9. Method precision and ruggedness

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) considers ruggedness as the method reproducibility and intermediate precision. The data obtained from linearity study was used for the evaluation of method ruggedness. The method reproducibility was determined from the % RSD of the recoveries obtained from nine samples prepared in triplicates at low (40 %), middle (100 %) and high (150 %) concentration levels of typical impurity tolerance level of corresponding related known impurities. The intermediate precision was determined from the difference in the average recoveries and the difference in the % RSD of the recoveries among the three analysts. The results for all the tested compounds are

listed in Table 5 which reveals that the method has good reproducibility and intermediate precision.

**Table 5.** Precision and recovery.

Analyte	Average recovery (%)			Diff from A-1(%)		% RSD of recovery			Diff from A-1(%)	
	A-1 <sup>d</sup>	A-2 <sup>d</sup>	A-3 <sup>d</sup>	A-2	A-3	A-1 <sup>d</sup>	A-2 <sup>d</sup>	A-3 <sup>d</sup>	A-2	A-3
<b>[A] Amlodipine basylate and its impurities</b>										
MBS*	98.17	101.49	97.30	3.32	0.87	3.16	1.33	1.73	1.83	0.40
Imp D	100.68	101.56	98.04	0.88	2.64	1.42	3.47	1.23	2.05	2.24
Imp A	98.80	100.66	99.97	1.86	1.17	1.64	1.91	1.82	0.27	0.09
<b>[B] Benazepril hydrochloride and its impurities</b>										
Imp E	99.36	97.30	98.32	2.06	1.04	0.87	1.10	2.23	0.23	1.13
Imp 4	97.70	98.28	98.03	0.58	0.33	2.12	1.69	0.86	0.43	0.83
Imp C	100.60	101.50	100.02	0.90	0.58	2.84	0.78	0.79	2.06	0.01
Imp F	97.30	97.62	99.66	0.32	2.36	2.46	1.96	0.94	0.50	1.02
Imp 2	99.40	98.38	99.28	1.02	0.12	0.26	0.51	1.72	0.25	1.21
Imp 3	97.11	100.10	99.15	2.99	2.04	3.56	3.28	1.94	0.28	1.34
Imp B	99.58	101.67	100.95	2.09	1.37	3.05	1.84	2.16	1.21	0.32
Imp D	98.55	101.76	101.00	3.21	2.45	1.16	1.83	0.96	0.67	0.87
Imp G	100.88	98.62	99.88	2.26	1.00	2.86	1.59	3.25	1.27	1.66

\* MBS – Methyl benzene sulfonate.; (d : n=6); Diff – Difference; A-1: Analyst-1; A-2: Analyst-2; A-3: Analyst-3

### 3.3.10. Robustness

In order to demonstrate the robustness of the method, system suitability parameters were verified by making deliberate changes in chromatographic conditions, i.e. change in flow rate by  $\pm 0.03 \text{ mL min}^{-1}$ , change in pH of the buffer by  $\pm 0.2$  units, change in column oven temperature by  $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , and change in organic composition of mobile phase by  $\pm 2 \%$  of the absolute. The sample spiked with all known impurities at impurity tolerance level was injected and the resolution among the impurities was monitored. The method was demonstrated to be robust over an acceptable working range of its UPLC operational conditions except the change in pH of buffer.

## 4. CONCLUSION

A stability study was carried out and an efficient UPLC method for the quantification of related substances of AB and BH in drug product was developed and validated. The results of the stress testing of the drug, undertaken according to the ICH guidelines, revealed that the degradation products were formed in hydrolytic (acid, base and water) and oxidative conditions.

Validation experiments provided proof that the

UPLC method is linear in the proposed working range as well as accurate, precise (repeatability and intermediate precision levels) and specific, being able to separate the main drug from its degradation products. The proposed method was also found to be robust with respect to flow rate, column oven temperature and composition of mobile phase. The method is sensitive to pH of mobile phase. Due to these characteristics, the method has stability indicating properties being fit for its intended purpose; it may find application for the routine analysis of the related substances of AB and BH in AB+BH capsule.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thanks to principal and management of Maulana Azad College, Dr. Rafiq Zakaria campus for providing excellent research facilities.

## 6. REFERENCES AND NOTES

- [1] Sica, D.A. *Drugs* **2002**, 62, 443. [[CrossRef](#)]
- [2] Drug bank showing drug card for amlodipine (DB00381).
- [3] Drug bank showing drug card for benazepril (DB00542).

- [4] United State Pharmacopeia-National Formulary USP32-NF27, Pharmacopial forum, 34, 1136 and 32, 1438
- [5] Chaudhari B. G.; Patel, N. M.; Shah, P. B. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 241. [[CrossRef](#)]
- [6] Mohammadi, A.; Rezanour, N.; Dogaheh, M. A.; Bidkorbeh, F. G.; Hashem, M.; Walker, R. B. *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *846*, 215 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [7] Sivakumar, T.; Manavalan, R.; Muralidharan, C.; Valliappan, K. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [8] Barman, R. K.; Islam, M. A.; Ahmed, M.; Wahed, M. I.; Islam, R.; Khan, A.; Hossain, M. B.; Rahman, B. M. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2007**, *20*, 274. [[PubMed](#)]
- [9] Argekar, A. P.; Powar, S. G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *20*, 1137. [[CrossRef](#)]
- [10] Dongre, V. G.; Shah, S. B.; Karmuse, P. P.; Phadke, M.; Jadhav, V. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 583. [[CrossRef](#)]
- [11] Chitlange, S. S.; Imran, M.; Sakarkar, D. M. *A. J. Pharm.* **2008**, *2*, 232.
- [12] Zarghi, A.; Foroutan, S. M.; Shafaati, A.; Khoddam, A. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [13] Yeung, K. F.; Mosher, S. J.; Pollak, P. T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, *9*, 565. [[CrossRef](#)]
- [14] Wu, Y. J.; Pan, Y. X.; Zeng, S. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2003**, *32*, 510. [[PubMed](#)]
- [15] Malesuik, M. D.; Cardoso, S. G.; Bajerski, L.; Lanzanova, F. A. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 359. [[PubMed](#)]
- [16] Zarghi, A.; Foroutan, S. M.; Shafaati, A.; Khoddam, A. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [17] Pandya, K. K.; Satia, M.; Gandhi, T. P.; Modi, I. A.; Modi, R. I.; Chakravarthy, B. K. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *667*, 315. [[CrossRef](#)]
- [18] Moraes, M. P.; Marchioretto, M. A.; Cassiano, N. M.; Bernasconi, G.; Calafatti, S. A.; Barros, F. A.; Meurer, E. C.; Pedrazzoli, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [19] Baranda, A. B.; Mueller, C. A.; Alonso, R. M.; Jiménez, R. M.; Weinmann, W. *Ther Drug Monit.* **2005**, *27*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [20] Yasuda, T.; Tanaka, M.; Iba, K. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 879. [[CrossRef](#)]
- [21] Chen, X. Y.; Luan, Y.; Zhong, D. F.; Du, Z. M. *Bao, Y. X. X.* **2001**, *36*, 51.
- [22] Feng, Y.; Zhang, L.; Shen, Z.; Pan, F.; Zhang, Z. *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 49. [[PubMed](#)]
- [23] Bhatt, J.; Singh, S.; Subbaiah, G.; Shah, B.; Kambli, S.; Ameta, S. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21*, 169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [24] Yuanyuan, M.; Feng, Q.; Xiaohong, S.; Xiumei, L.; Famei L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 1540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [25] Suchanova, B.; Kostiaainen, R.; Ketola, R. A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [26] Beresford, A. P.; Macrae, P. V.; Stopher, D. A.; Wood, B. A. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1987**, *420*, 178. [[CrossRef](#)]
- [27] Baranda, A. B.; Jiménez, R. M.; Alonso, R. M. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1031*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [28] Josefsson, M.; Zackrisson, A. L.; Norlander, B. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *672*, 310. [[CrossRef](#)]
- [29] Shimooka, K.; Sawada, Y.; Tatematsu, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1267. [[CrossRef](#)]
- [30] Abdel-Wadood, H. M.; Mohamed, N. A.; Mahmoud, A. M. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *70*, 564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [31] Rahman, N.; Singh, M.; Hoda, M. N. *Il Farmaco* **2004**, *59*, 913. [[CrossRef](#)]
- [32] Tatar, S.; Atmaca, S. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *758*, 305. [[CrossRef](#)]
- [33] Bahrami, G.; Mirzaeei, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [34] Gazy, A. A. K. *Talanta* **2004**, *62*, 575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [35] Altiokka, G.; Dogrukol-Ak, D.; Tunçel, M.; Aboul-Enein, H. Y. *Arch. Pharm. Weinheim.* **2002**, *335*, 104. [[CrossRef](#)]
- [36] Rahman, N.; Hoda, M. N. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 981. [[CrossRef](#)]
- [37] Wang, X. D.; Chan, E.; Chen, X.; Liao, X. X.; Tang, C.; Zhou, Z. W.; Huang, M.; Zhou, S. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 224. [[CrossRef](#)]
- [38] Bonazzi, D.; Gotti, R.; Andrisano, V.; Cavrini, V. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 431. [[CrossRef](#)]
- [39] Gana, M.; Panderi, I.; Parissi-Poulou, M.; Tsantili-Kakoulidou, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 107. [[CrossRef](#)]
- [40] Gindy, A. E.; Ashour, A.; Fattah, L. A.; Shabana, M. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 171. [[CrossRef](#)]
- [41] Gotti, R.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Bertucci, C.; Furlanetto, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 423. [[CrossRef](#)]
- [42] Hillaert, S.; Heyden, Y. V.; den Bossche, W. V. *J. Chromatogr. A* **2002**, *978*, 231. [[CrossRef](#)]
- [43] Hillaert, S.; den Bossche, W. V. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 775. [[CrossRef](#)]
- [44] Pommier, F.; Boschet, F.; Gosset, G. *J. Chromatogr. B.* **2003**, *783*, 199. [[CrossRef](#)]
- [45] Sioufi, A.; Pommier, F. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1988**, *434*, 239. [[CrossRef](#)]
- [46] Xiao, W.; Chen, B.; Yao, S.; Cheng, Z. *J. Chromatogr. B* **2005**, *814*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [47] Vonaparti, A.; Kazanis, M.; Panderi, I. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- [48] El-Yazbi, F. A.; Abdine, H. H.; Shaalan, R. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *20*, 343. [[CrossRef](#)]
- [49] Belal, F.; Al-Zaagi, I. A.; Abounassif, M. A. *Il Farmaco* **2000**, *55*, 425. [[CrossRef](#)]
- [50] Belal, F.; Al-Zaagi, I. A.; Abounassif, M. A. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1. [[PubMed](#)]
- [51] Naidu, K. R.; Kale, U. N.; Shingare, M. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [52] Meyyanathan, S. N.; Suresh, B. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [53] Kasawar, G. B.; Farooqui, M. N. *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [54] Sudhakar, P.; Nirmala, M.; Babu, J. M.; Vyas, K.; Reddy, G. M.; Bhaskar, B. V.; Reddy, P. P.; Mukkanti, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [55] Shinde, V. R.; Trivedi, A.; Upadhyay, P. R.; Gupta, N. L.; Kanase, D. G.; Chikate, R. C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [56] FDA, Center for drug evaluation and research (CDER), Centre for biologics evaluation and research (CBER), Guidance for industry, Analytical procedures and method validation (Chemistry, manufacturing and controls documentation) Rockville, USA, 2000.
- [57] Bakshi, M.; Singh, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 1011. [[CrossRef](#)]
- [58] Swartz, M.; Krull, I. *LCGC North America* **2005**, *23*, 586.
- [59] International Conference on Harmonization (ICH) Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products, USA, 2003.
- [60] Singh, S.; Bakshi, M. *Pharm. Tech.* **2000**, *24*, 1.
- [61] International Conference on Harmonization (ICH) Q1B, Stability testing; Photostability testing of new drug substances and products, USA, 1996.
- [62] International conference on Harmonization, (ICH) Q2 (R1): validation of analytical procedures- Test and Methodology, Geneva, Switzerland, 2005.
- [63] The United State Pharmacopeia, 30<sup>th</sup> ed., United state pharmacopeia convention, Rockville, USA, 2007.
- [64] British pharmacopeia, Her Majesty's Stationary office, Landon, UK, 2007.
- [65] Gorenstein, M. V.; Li, J. B.; van Antwerp, J.; Chapman, D. *LCGC North America* **1994**, *12*, 768.
- [66] Young, P. M.; Gorenstein, M. V. *LCGC North America* **1994**, *12*, 832.
- [67] Warren, W. J.; Stanick, W. A.; Gorenstein, M. V.; Young P. M. *Biotechniques* **1995**, *18*, 282. [[PubMed](#)]
- [68] FDA, Center for Drug Evaluation Research (CDER), Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods, Washington, USA, 1994.
- [69] Epshtein, N. A. *Pharm. Chem. J.* **2004**, *34*, 212. [[CrossRef](#)]

## A Descrição Matemática do Desempenho Eletroanalítico de Nanopartículas de Óxido de Cobre(II) na Eletrodetecção de Hidrazina

V. Tkach<sup>a</sup>, R. Ojani<sup>b</sup>, V. Nechyporuk<sup>a</sup>, P. Yagodynets<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Nacional de Chernivtsi, Ucrânia

<sup>b</sup> Universidade de Mazandarã, República Islâmica do Irã

*Article history:* Received: 13 March 2014; revised: 22 June 2014; accepted: 23 June 2014. Available online: 20 September 2014.

**Abstract:** The electroanalytic function of copper(II) oxide nanoparticles, disposed over the glassy carbon electrode, in the electrochemical detection of hydrazine in strongly basic media gets its phenomenological mechanism. This mechanism, based on experimental data, is also described mathematically and the respective method is analyzed by means of linear stability theory and bifurcation analysis. The model investigation confirms the suggested mechanism and is confirmed by experimental data of sensor function. The oscillatory and monotonic instabilities' occurrence was also verified.

**Keywords:** copper nanoparticles; hydrazine; electrochemical analysis; glassy carbon electrode; stable steady-state

### 1. INTRODUÇÃO

Hidrazina é a diamina mais simples e o composto-base para vários derivados, que podem ser usados em soluções combustíveis, inibidores de corrosão, catalisadores, pesticidas, corantes e fármacos [1].

Apesar de ser muito usada, a hidrazina é uma substância cancerígena e hepatotóxica, por isso o desenvolvimento dos métodos que detectem suas baixas concentrações é muito importante. Quando comparados a outros métodos de análise, os métodos eletroquímicos apresentam, como vantagens, baixo custo, rapidez e baixos limites de detecção.

Já foram desenvolvidos vários métodos da detecção de hidrazina [2–4]. O mecanismo da sua eletrooxidação foi investigado nos elétrodos de prata [5], níquel [6], mercúrio [7–9] e platina [10] e foi observado que os sobrepotenciais da eletrooxidação da hidrazina sobre os metais nobres são inferiores aos da eletrooxidação sobre os outros metais. Outrossim, o comportamento oscilatório em potencial foi observado aquando da eletrooxidação da hidrazina sobre platina [11], o que também põe em questão o porquê e a probabilidade da aparição de instabilidades eletroquímicas. Sem embargo, os metais nobres são muito caros e os elétrodos de grafite não são usados

neste processo por causa do sobrepotencial elevado. Neste contexto, destaca-se a modificação de elétrodos com vários materiais mediadores [12–17], com ênfase no uso de nanopartículas [12–13], dióxido de titânio [14] e polímeros condutores [15–17].

Existe um grande interesse no preparo de elétrodos modificados por nanopartículas, tanto na forma isolada, mas convencional, quanto na forma de compósitos [18–27], porque elas têm propriedades magnéticas, elétricas, químicas e óticas, que são inatingíveis por outras formas das mesmas substâncias. As nanopartículas inorgânicas têm ótima atividade, força catalítica e alta área ativa, promovem o transporte de massas e controlam o microambiente do elétrodo [28–30]. As nanopartículas de cobre e seus óxidos já têm sido utilizadas como catalisadores da oxidação de biossubstâncias como aminoácidos carboidratos e peptídeos [31]. Além disso, os derivados de cobre também são utilizados como iniciadores de polimerização [32–34].

Apesar da existência de muitos elétrodos modificados, o problema da confecção de um elétrodo, capaz de oxidar hidrazina em condições ótimas, com baixas sobrevoltagens e, preferencialmente, sem instabilidades eletroquímicas, permanece sendo um

\*Corresponding author. E-mail: [nightwatcher2401@gmail.com](mailto:nightwatcher2401@gmail.com)

tema atual.

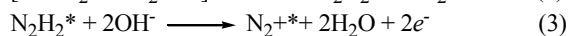
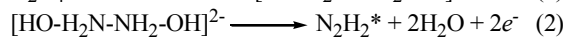
Outro problema é a detecção do mecanismo mais provável da oxidação de hidrazina e a possibilidade da concorrência de dois mecanismos de processo eletródico em certas condições. Um modelo fenomenológico, capaz de descrever aprazivelmente os dados experimentais poderia dar-lhes uma explicação lógica, porém só um modelo matemático, capaz de descrever adequadamente os dados experimentais, tem melhor base teórica, concordando (na íntegra ou parcialmente) ou contrariando os modelos fenomenológicos e dando-lhes a explicação.

No trabalho [35] foi descrito o sensor de hidrazina, baseado nas nanopartículas do óxido de cobre (II) em meio fortemente básico e foi observada a concorrência dos dois mecanismos diferentes da eletrooxidação de hidrazina (com e sem participação de nanopartículas do óxido do cobre). Neste trabalho, sugere-se o mecanismo da eletrooxidação de hidrazina no meio alcalino que vai ao encontro dos dados experimentais e obtendo-se, assim, a base para o modelo matemático, apresentado e analisado per meio da teoria de estabilidade linear e da análise de bifurcações.

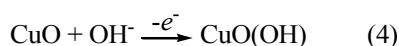
Antes, foram desenvolvidos os modelos para os casos do desempenho de sensores eletroquímicos, baseados em polímeros condutores. [36–41]

### O mecanismo e a sua representação matemática

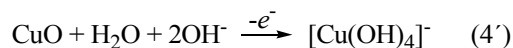
Apesar de o mecanismo da eletrooxidação de hidrazina seja muito difícil de confirmar, o primeiro composto intermediário parece ser o ânion  $[\text{HO}-\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2-\text{OH}]^{2-}$ . Baseando-se no trabalho [42], para a oxidação da hidrazina pode ser suposto o mecanismo:



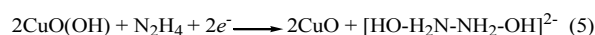
O asterisco significa a partícula adsorvida ou sítio livre de adsorção. Com a presença de nanopartículas de  $\text{CuO}$ , o mecanismo é modificado. O efeito catalítico é alcançado por causa da formação dos compostos do cobre(III), que só podem formar-se em meio alcalino sob a forma de óxido, oxi-hidroxocompostos e complexos. Por exemplo, o oxi-hidroxocomposto é formado conforme a reação:



e o íon complexo, conforme a



Os compostos do cobre(III) são altamente instáveis e oxidam a hidrazina rapidamente segundo a reação:



No caso do complexo, a oxidação vai realizar-se conforme a equação:



No caso do trabalho [35], o composto ativo de cobre (III) foi o oxi-hidroxocomposto. Conforme citado na figura 3 do mencionado trabalho, o aumento da concentração da base forte aumentava a intensidade do pico e reduzia o potencial da oxidação, haja vista a participação da base tanto na oxidação de hidrazina, quanto na formação do derivado do cobre (III). Tal tendência se preserva até o limite, regulado pela concentração de hidrazina e de nanopartículas de cobre, pois o excesso da base faz as perdas dela desprezíveis e a concentração dela quase constante.

A eletrooxidação da hidrazina no modo potencioestático (sendo o potencial aplicado o um pouco superior ao do pico do processo eletroquímico mais “positivo”), no meio alcalino e com o uso de nanopartículas de cobre pode ser descrito matematicamente com o uso do modelo que utiliza 3 variáveis:

$c$  – a concentração da hidrazina na camada pré-superficial;

$\theta$  – o grau do recobrimento da superfície pela partículas da cobre (II)

$a$  – a concentração da base na camada pré-superficial.

Para manter o controle dos mecanismos de transporte apenas pela difusão, a solução eletrolítica deve estar sob intensa agitação e conter um eletrólito-suporte em excesso quando comparado ao analito no intuito de evitarmos o transporte por convecção e migração. O gradiente de concentração do analito na camada pré-superficial é suposto sendo linear e a espessura da camada, constante e igual a  $\delta$ .

A hidrazina entra na camada pré-superficial por meio da sua difusão e a sua concentração diminui aquando da oxidação eletroquímica direta (primeiro mecanismo), e da promovida pelo cobre (III) (segundo mecanismo). Destarte, a equação de balanço da hidrazina poderá descrever-se como:



$$\frac{dc}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{\Delta}{\delta} (c_b - c) - r_1 - r_2 \right) \equiv F_1 \quad (6)$$

Sendo  $c_b$  a concentração da hidrazina no interior da solução,  $r_1$  e  $r_2$  as velocidades das reações de oxidação direta e promovida pelo cobre (III).

O cobre (II) forma-se durante a interação entre a hidrazina e o cobre (III) e é oxidada eletroquimicamente até esta. Assim, a equação de balanço da concentração superficial do cobre (II) pode ser descrita como:

$$\frac{d\theta}{dt} = \Gamma^{-1}_{\max} (r_2 - r_3) \equiv F_2 \quad (7)$$

Sendo  $\Gamma_{\max}$  a concentração máxima de nanopartículas do cobre (II),  $r_3$  a velocidade da reação da oxidação.

A base entra na camada pré-superficial aquando da sua difusão. A sua concentração diminui nos processos da oxidação de hidrazina e da formação do cobre (III). Assim sendo, a sua equação de balanço vai ser descrita como:

$$\frac{da}{dt} = \frac{2}{\delta} \left( \frac{D}{\delta} (a_b - a) - r_1 - r_2 - r_3 \right) \quad (8)$$

Sendo  $D$  e  $\Delta$  os coeficientes de difusão,  $a_b$  a

$$a_{11} = \frac{\partial F_1}{\partial c} = \frac{2}{\delta} \left( -k_1 a^n - k_2 (1-\theta) a^\pi - \frac{\Delta}{\delta} \right) \quad a_{12} = \frac{\partial F_1}{\partial \theta} = \frac{2}{\delta} k_2 c a^\pi \quad a_{13} = \frac{\partial F_1}{\partial a} = \frac{2}{\delta} \left( -k_2 p (1-\theta) a^{p-1} - k_1 n a^{n-1} \right)$$

$$a_{21} = \frac{\partial F_2}{\partial c} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} (k_2 (1-\theta)) \quad a_{22} = \frac{\partial F_2}{\partial \theta} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} \left( -k_2 a^p c - k_3 a^j \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) - Tk_3 a \theta \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) \right)$$

$$a_{23} = \frac{\partial F_2}{\partial a} = \Gamma_{\max}^{-1} \left( k_2 p (1-\theta) a^{p-1} - j k_1 a^j \theta_N \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) \right)$$

$$a_{31} = \frac{\partial F_3}{\partial c} = -\frac{2}{\delta} k_2 (1-\theta) a^\pi \quad a_{32} = \frac{\partial F_3}{\partial \theta} = -\frac{2}{\delta} \left( -k_2 a^p c + k_3 a^j \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) + Tk_3 a \theta \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) \right)$$

$$a_{33} = \frac{\partial F_3}{\partial a} = -\frac{2}{\delta} \left( k_2 a^p c - k_3 a^j \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) + Tk_3 a \theta \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right) + k_2 p (1-\theta) a^{p-1} + k_1 n a^{n-1} + \frac{D}{\delta} \right) \quad (13-22)$$

Sendo que  $T = d\phi_0/dt$ .

Para simplificar o jacobiano e evitar a aparição de expressões grandes, introduzimos as novas variáveis de modo que o jacobiano é escrito em forma de: Det J =

$$\frac{4}{\delta^2 \Gamma_{\max}} \begin{vmatrix} -X - Y - \kappa_1 & \Pi & -Z - H \\ X & -\Pi - \Omega & Z - P \\ -X & \Pi - \Omega & -Z - H - P - \kappa_2 \end{vmatrix} \quad (23)$$

$$(-Y - \kappa_1)(\Omega Z + \Pi H + \Omega H + \Pi P + \Pi \kappa_2 + \Omega \kappa_2 + \Pi P + \Omega Z) - X(\Pi P + \Omega \kappa_2 + \Pi P + \Omega Z) < 0 \quad (24)$$

concentração da base no interior da solução.

As velocidades das respectivas reações podem ser calculadas como:

$$r_3 = k_3 a^j \theta \exp\left(\frac{zF\phi_0}{RT}\right); \quad r_2 = k_2 (1-\theta) a^p c$$

$$r_1 = k_1 a^n c \quad (9-11)$$

Sendo os parâmetros  $k$  as constantes das reações,  $z$  a quantidade de elétrons transferidos,  $F$  o número de Faraday,  $\phi_0$  o salto do potencial, relativo ao da carga zero,  $j$ ,  $p$  e  $n$  são as ordens das reações do álcali.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento do sistema será analisado por meio da teoria de estabilidade linear e da análise de bifurcações. Os elementos estacionários do Jacobiano serão descritos como:

$$J = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \quad (12)$$

Sendo:

Haja visto o critério de estabilidade de Routh-Hurwitz, a condição de estabilidade do estado estacionário pode ser descrita com a inequação Det J < 0, ou:

Mesmo sem abrir os parênteses, é possível ver que a inequação se satisfaz na vasta região topológica de parâmetros e o estado estacionário permanece estável no caso da ausência de influências fortes da formação do cobre(III) à dupla camada (negatividade da variável  $\Omega$ , a única capaz de ser negativa). A estabilidade do estado estacionário é correspondida à dependência linear na curva “parâmetro eletroquímico – concentração do analito”. Isto vai ao encontro das conclusões do trabalho [35] e, em consequência, confirma o mecanismo. Outrossim, o fato de o aumento do valor da variável  $\kappa_1$  favorecer a estabilidade do estado estacionário (inclinação do valor do lado esquerdo da expressão (24) até os valores mais

$$(-Y - \kappa_1)(\Omega Z + \Pi H + \Omega H + \Pi P + \Pi \kappa_2 + \Omega \kappa_2 + \Pi P + \Omega Z) - X(\Pi P + \Omega \kappa_2 + \Pi P + \Omega Z) = 0 \quad (24)$$

Tal instabilidade pode ver-se no trecho “N-formado” no voltamperograma, significando que há 3 valores de potencial, correspondentes ao concreto valor de corrente, sendo cada correspondente a um dos estados estacionários que coexistem no ponto, sendo cada um instável.

Para a instabilidade oscilatória ser realizada, é preciso (não sendo suficiente) que a diagonal principal da matriz de Jacobi contenha os elementos positivos, pois eles descrevem a positiva ligação de retorno, ou seja, autocatálise no sentido mais amplo do termo.

Apenas um elemento da diagonal principal é capaz de ser positivo:  $-\Omega$ , definindo a única causa do comportamento oscilatório neste sistema (não havendo reações autocatalíticas), que são as influências da formação eletroquímica do cobre (III) na dupla camada. A formação do complexo  $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^-$ , bem como do oxi-hidroxocomposto  $\text{CuO}(\text{OH})$  faz com que a dupla camada mude a sua estrutura, mas, como os compostos do cobre (III) são instáveis, eles destroem-se logo, voltando o sistema ao estado estacionário inicial (estável). Isto explica a aparição das oscilações de pequena amplitude, mostradas no trabalho [35], que pouco afetam, aliás, quase não afetam a exatidão do sensor.

Usar-se-á o mesmo modelo, com algumas suposições, não só para o caso das nanopartículas de cobre isoladas, mas também para os compósitos delas com os polímeros condutores. Supondo o excesso da base forte e separando os papéis das nanopartículas de cobre (substância ativa) e polímero condutor (mediador), poderá ser usado o modelo, descrito em [41], que também confirma o exposto em [35].

#### 4. CONCLUSÃO

negativos, confirma a tese de a reação ser controlada pela difusão. Outro fator estabilizador é a alta velocidade da oxidação de hidrazina (acompanhada pela desapareção do cobre(III)) (altos valores de  $X$ ,  $Y$ ,  $\Pi$  e  $Z$ ), bem como o crescimento do pH.

A estabilidade de estado estacionário, realizada para a maioria dos valores dos parâmetros explica também a alta estabilidade do compósito o que também é experimentalmente observado em [35].

A igualdade de influências do rearranjo da dupla camada às outras pode causar a instabilidade monotônica, a condição de cuja aparição é:

O mecanismo da oxidação eletrocatalítica da hidrazina, incluindo a participação dos compostos do cobre(III), foi sugerido. A sua confirmação vem ao encontro tanto dos dados experimentais, quanto da modelagem matemática, que o fundamenta.

O modelo matemático confirma a alta exatidão do sensor, bem como a alta eficiência das nanopartículas do óxido de cobre (II) na eletrooxidação da hidrazina. Os fatores principais da estabilização do estado estacionário são a ausência das influências fortes na dupla camada elétrica, alta velocidade da difusão do analito e do álcali, e a alta velocidade da reação do cobre(III).

As oscilações eletroquímicas podem acontecer neste sistema, sendo causadas pelo rearranjo da dupla camada, causadas pela formação dos compostos de cobre(III), mas como este é instável, logo se reduz até cobre(II), voltando o estado estacionário a ser estável de novo. Destarte, existem as estruturas dissipativas temporais neste sistema.

O mecanismo pode ser aplicado não só para os casos das nanopartículas isoladas, mas também (com algumas restrições) para o caso do desempenho do seu compósito com os polímeros condutores.

#### 5. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Mark, H. F.; Othmer, D. F.; Overberger, C. G.; Seaborg, G. T. Kirk-Othmer Encyclopedia Chemical Technology, 5<sup>th</sup> Ed. Wiley, Nova York, 2005.
- [2] Zhao, C.; Song, J.; Zhang, J. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 2111. [[CrossRef](#)]
- [3] Wu, S. H.; Chen, D. H. *J. Coll. Inter. Sci.* **2003**, *259*, 282. [[CrossRef](#)]
- [4] Holmstrom, S. D.; Sandlin, Z. D.; Steinecker, W. H.; Cox, J. A. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 262. [[CrossRef](#)]

- [5] Korinek, K.; Korita, J.; Nusiloua, M. *J. Electroanal. Chem.* **1969**, *21*, 319. [[CrossRef](#)]
- [6] Fleischmann, M.; Korinek, K.; Piewner, D. *J. Electroanal. Chem.* **1972**, *34*, 499. [[CrossRef](#)]
- [7] Karr, S.; Meites, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 906. [[CrossRef](#)]
- [8] Harrison, J. A.; Khan, Z. A. *J. Electroanal. Chem.* **1970**, *26*, 1. [[CrossRef](#)]
- [9] Batchelor-McAuley, C.; Banks, C. E.; Simm, A. O.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G. *Analyst* **2006**, *131*, 106. [[CrossRef](#)]
- [10] Maleki, N.; Safavi, A.; Farjami, E.; Tajabadi, F. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *611*, 151. [[CrossRef](#)]
- [11] Horanyi, G.; Inzelt, G.; Izetey, E. *J. Electroanal. Chem.* **1977**, *81*, 395. [[CrossRef](#)]
- [12] Mehta, S. K.; Singh, K.; Umar, A. Chaudhary, G.R.; Singh, S. *Electrochem. Acta* **2012**, *69*, 128. [[CrossRef](#)]
- [13] Liu, J.; Li, Y.; Jiang, J.; Huang, X. *Dalton Trans.* **2010**, *37*, 8693. [[CrossRef](#)]
- [14] Ojani, R.; Zarei, E. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 657.
- [15] Oukil, D.; Benhaddad, L.; Makhoulfi, L. *Sens. Lett.* **2013**, *11*, 295. [[CrossRef](#)]
- [16] Virji, S.; Kaner, R. B.; Weiller, B. H. *Pol. Prep.* **2005**, *46*, 538.
- [17] Shu, H. Applications of poly(3-hexylthiophene) thin film as a hydrazine-sensitive chemoresistor, M. Sc. Thesis, Alburn, Alabama, 2006.
- [18] Vaucher, S.; Li, M.; Mann, S. *Angew. Chem. Int.* **2000**, *39*, 1793. [[CrossRef](#)]
- [19] Wang, L.; Sunb, Y.; Chea, G.; Li, Z. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 7150. [[CrossRef](#)]
- [20] Hassan, P.; Sawant, S. N.; Bagkar, N. C.; Yakhmi, J. V. *Langmuir* **2004**, *20*, 4874. [[CrossRef](#)]
- [21] Ojani, R.; Raof, J.-B.; Maleki, A. A.; Safshekan, S. *Chin. J. Cat.* **2014**, *35*, 423. [[CrossRef](#)]
- [22] Raof, J.; Ojani, R.; Hosseini, S. R. *South Afr. J. Chem.* **2013**, *66*, 47.
- [23] Ojani, R.; Raof, J. B.; Hosseini, S. R. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 2402. [[CrossRef](#)]
- [24] Ojani, R.; Raof, J. B.; Ahmady, A.; Hosseini, S. R. *Casp. J. Chem.* **2013**, *2*, 45.
- [25] Ojani, R.; Raof, J. B.; Afagh, P. S. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *571*, 1. [[CrossRef](#)]
- [26] Ferrer, J. H. Caracterización Electroquímica de nanopartículas de oro. Relacion de la forma tridimensional de la partícula y su orientación superficial, Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, 2008.
- [27] Rovira, J. P. T. Estudio de la inmovilización de oligonucleótidos a electrodos modificados de oro: polipirrol, y detección electroquímica de secuencias complementarias, Tes. Lic. Bioquím., Universidad de la República, Montevideo, 2008.
- [28] Domínguez-Vera, J. M.; Colacio, E. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6983. [[CrossRef](#)]
- [29] Cho, E. C.; Claus, G.; Chen, J. Welch, M. J.; Xia, Y. *Trend Mol. Med.* **2010**, *16*, 561. [[CrossRef](#)]
- [30] Setua, P.; Pramanik, R.; Sarkar, S.; Ghatak, C.; Rao, V. G.; Sarkar, N.; Das, S. K. *J. Mol. Liq.* **2011**, *162*, 33. [[CrossRef](#)]
- [31] Brazill, S. A.; Singhal, P.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5542. [[CrossRef](#)]
- [32] Basáez, L.; Arredondo, O.; Bustos, F. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2001**, *46*, 217.
- [33] Navasivayam, N. *Pol. J.* **1985**, *17*, 1111. [[CrossRef](#)]
- [34] Simonescu, C.; Mihailescu, C.; Dumitriu, S.; Simionescu, B. *Pol. Bull.* **1983**, *9*, 21. [[CrossRef](#)]
- [35] Raof, J. B.; Ojani, R.; Jamali, F.; Hosseini, S. R. *Casp. J. Chem.* **2012**, *1*, 73.
- [36] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P.; Rusnak, I. *Orbital: Electron. J. Chem.* **2012**, *4*, 136.
- [37] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P. *Rev. Colomb. Cien. Quím. Farm.* **2013**, *42*, 30.
- [38] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **2013**, *42*, 215.
- [39] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **2012**, *41*, 203.
- [40] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P. Livro de resumos do XVIII Encontro Luso-Galego de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 28 a 30 de novembro de 2012, P. 29.
- [41] Tkach, V.; Nechyporuk, V.; Yagodynets', P. I.; Meslyuk Yu, V. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2011**, *77*, 259.
- [42] Rosca, V.; Koper, M. T. M. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5199. [[CrossRef](#)]

## Oxidação do Ciclopirox em Eletrodo de Diamante: Estudo do Comportamento Voltamétrico e Determinação Eletroanalítica

Michely Cristina Gardenal Santos, Camila Farinha Valezi, Jessica Scremin, Elen Romão Sartori\*

*Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, CEP: 86057-970, Londrina – PR, Brasil.*

*Article history:* Received: 05 July 2014; revised: 08 August 2014; accepted: 14 August 2014. Available online: 21 September 2014.

**Abstract:** In this work was developed a simple and sensitive method for the analytical determination of ciclopirox in pharmaceutical formulations using the square-wave voltammetry (SWV) and a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode (BDDE). The BDDE provided a linear response to ciclopirox in the concentration range from  $5.0 \times 10^{-7}$  to  $6.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> and a detection limit of  $1.5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. A paired t-test showed that all of the results obtained for ciclopirox in dermatological cream and topical solution using the proposed voltammetric method and the official method agreed at the 95% confidence level.

**Keywords:** ciclopirox determination; voltammetric method; diamond electrode; cathodic pretreatment

### 1. INTRODUÇÃO

O ciclopirox olamina é uma droga com propriedades antifúngicas que é empregada para o tratamento das micoses cutâneas superficiais causadas por agentes patogênicos [1, 2]. Para garantir o sucesso do tratamento pelo paciente, é necessária que a quantidade de ciclopirox prescrita pelo médico seja a indicada no rótulo do produto, fazendo-se necessário um controle de qualidade dos produtos farmacêuticos que o contêm. Nesse sentido, tem sido crescente o interesse no desenvolvimento de procedimentos analíticos simples e viáveis para a determinação deste analito em produtos farmacêuticos.

Alguns procedimentos analíticos para a determinação de ciclopirox em matéria-prima, soluções tópicas e cremes dermatológicos empregam cromatografia gasosa, [2] cromatografia líquida, [3-8] eletroforese capilar [9] e espectrofluorimetria [10]. Muitos desses procedimentos não são simples para um controle de qualidade rápido do ciclopirox em formulações farmacêuticas. Outros métodos são morosos e/ou empregam reagentes orgânicos, além de instrumentos de alto custo e/ou sofisticados.

Os métodos eletroanalíticos têm sido propostos como alternativa a estas técnicas [2, 11-13]. A

Farmacopeia Britânica emprega a titulação potenciométrica do ciclopirox como método de referência [2]. A polarografia de pulso diferencial (PPD) foi utilizada por Ibrahim e El-Enany [11, 12] para a quantificação de ciclopirox em formulações farmacêuticas empregando o eletrodo gotejante de mercúrio (EGHg). Mais recentemente, Angnes e colaboradores [13] propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica para a determinação de ciclopirox em produtos farmacêuticos, no qual em ambos os procedimentos foi empregado o eletrodo de carbono vítreo (ECV).

As técnicas voltamétricas em conjunto com o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) têm se mostrado como uma alternativa conveniente para o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação individual ou simultânea de diferentes princípios ativos em formulações farmacêuticas [14-22], uma vez que estes são, em geral, simples, rápidos, seletivos, sensíveis e econômicos para essa finalidade. O EDDB tem sido amplamente empregado na eletroanálise, principalmente por apresentar extensa janela de potencial (-1,5 V a 2,5 V vs. Ag/AgCl), fraca adsorção de moléculas polares, e estabilidade quando pré-tratado adequadamente [23-25]. O pré-tratamento anódico da sua superfície do

\*Corresponding author. E-mail: [elensartori@uel.br](mailto:elensartori@uel.br)

EDDB é conhecido por introduzir grupos funcionais de oxigênio e o pré-tratamento catódico modifica a superfície do diamante através da introdução de grupos funcionais de hidrogênio [26-30].

Neste trabalho, o EDDB foi empregado em conjunto com a voltametria de onda quadrada (VOQ) para o desenvolvimento de um procedimento analítico para a determinação de ciclopirox em formulações farmacêuticas (creme dermatológico e solução tópica), cujos resultados obtidos foram comparados com aqueles empregando o método de referência da Farmacopeia Britânica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e soluções

Todas as soluções empregadas nos experimentos foram preparadas a partir de reagentes comerciais de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada, purificada em um sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA), modelo UV-Plus ultrabaixo teor de substâncias orgânicas dissolvidas. As amostras contendo ciclopirox olamina, em forma de loção e creme, foram adquiridas em drogarias da cidade de Londrina, estado do Paraná, Brasil.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) foi utilizado como eletrólito suporte, sendo preparado pela mistura de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico, cada qual na concentração  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ . Para o ajuste do pH desejado, foi utilizado uma solução de NaOH  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

A solução estoque de ciclopirox  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada diariamente dissolvendo-se  $0,0268 \text{ g}$  deste composto em um balão volumétrico de  $10 \text{ mL}$  com tampão BR (pH 7,0) contendo 30% de etanol, para garantir a solubilização do analito. A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de ciclopirox empregadas neste trabalho. Todas essas soluções foram armazenadas em frasco âmbar.

### Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato PalmSens gerenciado pelo programa PalmSens PC e para o tratamento da superfície do EDDB, foi utilizado um potenciostato MQPG-01 (Microquímica). Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula de vidro de

compartimento único de  $15 \text{ mL}$  equipada com uma tampa de Teflon®, contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e uma placa de platina de  $0,5 \text{ cm}$  de largura e  $1 \text{ cm}$  de comprimento, respectivamente. O eletrodo de referência foi construído inserindo-se um fio de prata recoberto anodicamente com AgCl(s) em um tubo de vidro de  $3 \text{ mm}$  de diâmetro interno contendo solução de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ , no qual uma das extremidades continha um disco de vidro sinterizado. O mesmo foi mantido imerso na mesma solução de preenchimento, em  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . O eletrodo de trabalho utilizado nas medidas voltamétricas foi um eletrodo de diamante dopado com boro (8000 ppm) com área geométrica de  $0,26 \text{ cm}^2$ , produzido pela Adamant, Suíça. Esse eletrodo foi sintetizado sobre um substrato de silício pela técnica de HFCVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), cuja fase gasosa consistia em metano ( $\text{CH}_4$ ), com excesso de hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e trimetilboro como gás de dopagem. Detalhes da preparação destes filmes foram reportados por Gandini et al. [31]. Antes dos experimentos, o EDDB foi pré-tratado anodicamente numa solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , por aplicação de  $0,5 \text{ A cm}^{-2}$  durante  $40 \text{ s}$ , e em seguida foi pré-tratado catodicamente nessa mesma solução, por aplicação de  $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$  durante  $120 \text{ s}$ . Dessa forma, a superfície do EDDB foi predominantemente terminada em hidrogênio. A seleção deste procedimento de pré-tratamento é discutido em detalhes em Resultados e Discussão.

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro Hanna Instruments, modelo HI-221 e um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externa de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

### Procedimentos analíticos

A voltametria cíclica (VC) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) foram utilizadas para investigar o comportamento voltamétrico do ciclopirox ou a sua quantificação em formulações farmacêuticas.

A curva analítica para ciclopirox foi obtida pela adição de alíquotas da solução padrão de ciclopirox na célula eletroquímica. O limite de detecção (LD) foi calculado a partir da média aritmética de  $10$  voltamogramas do branco, obtidos das correntes medidas no mesmo potencial de pico de

oxidação do analito, e a seguinte relação:  $LD = 3SB/b$ , onde SB corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e  $b$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica. O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, obtidos das correntes medidas no mesmo potencial de pico de oxidação do analito, e a seguinte relação:  $LQ = 10SB/b$ , onde SB corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e  $b$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

A amostra de creme dermatológico foi preparada pela pesagem de uma quantidade adequada desta e posterior dissolução em tampão BR (pH 7,0) contendo 30% de etanol, para garantir a solubilização do ciclopirox. Eventuais excipientes insolúveis contidos nas amostras foram removidos por filtração simples por gravidade em papel de filtro. Para o preparo da solução tópica, procedeu-se a simples diluição de uma quantidade adequada da mesma em tampão BR (pH 7,0) contendo 30% de etanol. Antes das análises, alíquotas de cada solução estoque da amostra foram diluídas, adequadamente, na faixa linear de trabalho em meio de tampão BR (pH 7,0) para as análises. Para o procedimento proposto, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra contendo ciclopirox foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão BR (pH 7,0) e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. A concentração de ciclopirox em cada amostra foi determinada diretamente utilizando a curva analítica previamente obtida com soluções de referência de ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

As medidas para a determinação de interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais estabelecidas para o ciclopirox. Cada um dos concomitantes foi analisado sob uma concentração constante de ciclopirox, sendo a proporção 1:1, 1:10 e 1:100 (m/m) analito:concomitante.

O teste de recuperação foi realizado adicionando-se às soluções das amostras, quantidades conhecidas de ciclopirox. Para este, descontou-se 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 procedimento potenciométrico descrito na Farmacopeia Britânica [2] foi aplicado como método de referência para a validação do procedimento

proposto. As amostras comerciais analisadas foram dissolvidas em metanol e tituladas potenciométricamente com auxílio de um eletrodo de vidro, empregando-se NaOH  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$  como titulante. O volume final da titulação foi usado para calcular o teor de ciclopirox nas amostras comerciais.

### 3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

#### Investigação do comportamento voltamétrico do ciclopirox no EDDB

Inicialmente foram realizados experimentos de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação e/ou de redução do ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície do EDDB em tampão BR (pH 7,0). Pela Figura 1 pode-se observar que o ciclopirox apresenta um pico de oxidação em torno de  $+0,66 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}\text{)}$ , com características de um processo irreversível, uma vez que o voltamograma não apresenta pico no sentido da varredura reversa.

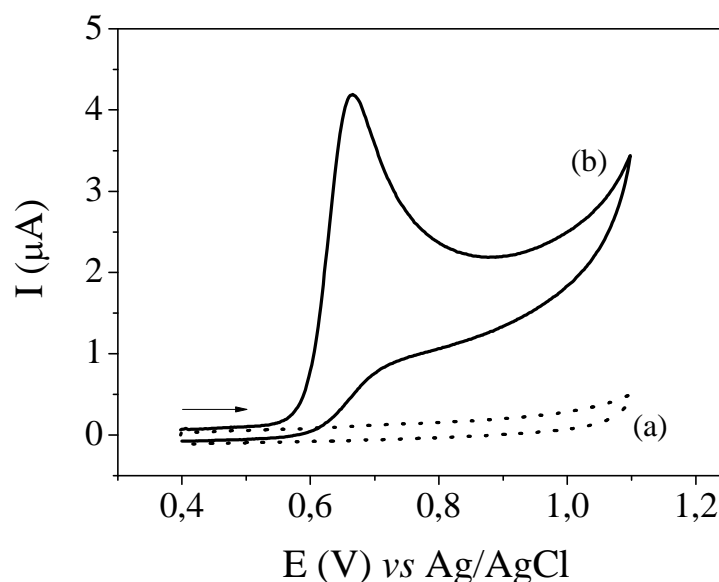
#### Efeito do pré-tratamento no EDDB na resposta voltamétrica do ciclopirox

Foi realizado um estudo do efeito do pré-tratamento do EDDB na resposta voltamétrica do ciclopirox. Os voltamogramas obtidos para o ciclopirox sobre o EDDB após os pré-tratamentos anódico e catódico, são mostrados na Figura 2. Com o pré-tratamento catódico o EDDB apresentou um menor potencial de oxidação, repetibilidade entre as medidas de corrente, bem como um perfil voltamétrico mais bem definido para a oxidação do ciclopirox, selecionando este tipo de pré-tratamento para a determinação de ciclopirox. Este pré-tratamento foi realizado uma vez a cada dia de trabalho e precedido de um pré-tratamento anódico de 30 s, para garantir resultados reprodutíveis.

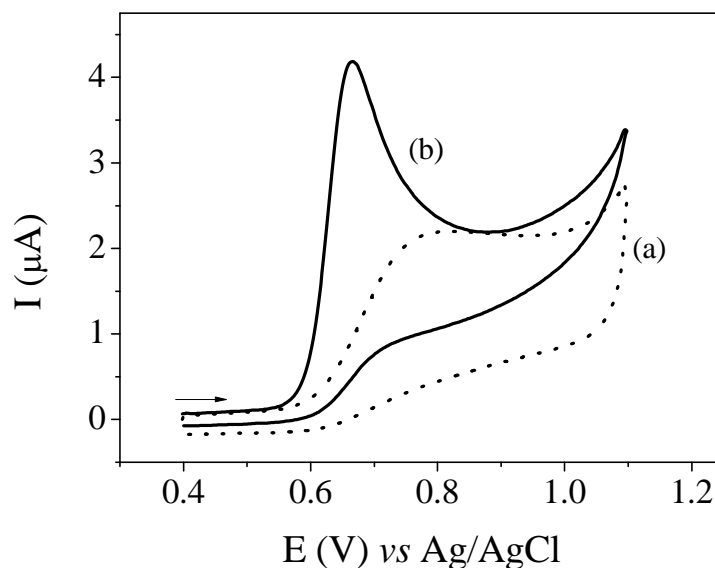
O número de elétrons ( $n$ ) transferidos na eletro-oxidação do ciclopirox no EDDB pode ser estimado pela equação:  $E_p - E_{p/2} = 47,7 \text{ mV}/an$  [32]. Os valores de  $E_p = 0,664 \text{ V}$  e  $E_{p/2} = 0,619 \text{ V}$  foram obtidos do voltamograma para a oxidação do ciclopirox usando o EDDB pré-tratado catodicamente (Figura 2). Assumindo 0,5 para o valor do coeficiente de transferência ( $\alpha$ ), que é comumente empregado para sistemas totalmente irreversíveis [33],  $n$  pode ser estimado como 2. Levando-se em conta que o  $\text{pK}_a$  desta molécula é 6,84 [34], verifica-se que oxidação

do ciclopirox na superfície do EDDB em tampão BR (pH 7,0) envolve apenas a participação de elétrons (2 elétrons), uma vez que a mesma sofre desprotonação em eletrólitos alcalinos. Trabalhos anteriormente

realizados com o mesmo analito, em valores menores de pH, indicaram que a oxidação do ciclopirox ocorre no grupo N—OH da molécula [11-13].



**Figura 1.** Voltamogramas cíclicos ( $40 \text{ mV s}^{-1}$ ) empregando o EDDB, na ausência (a) e na presença de ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (b) em tampão BR (pH 7,0).



**Figura 2.** Voltamogramas cíclicos ( $40 \text{ mV s}^{-1}$ ) para o ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH 7,0) empregando-se o EDDB com pré-tratamento (a) anódico e (b) catódico.

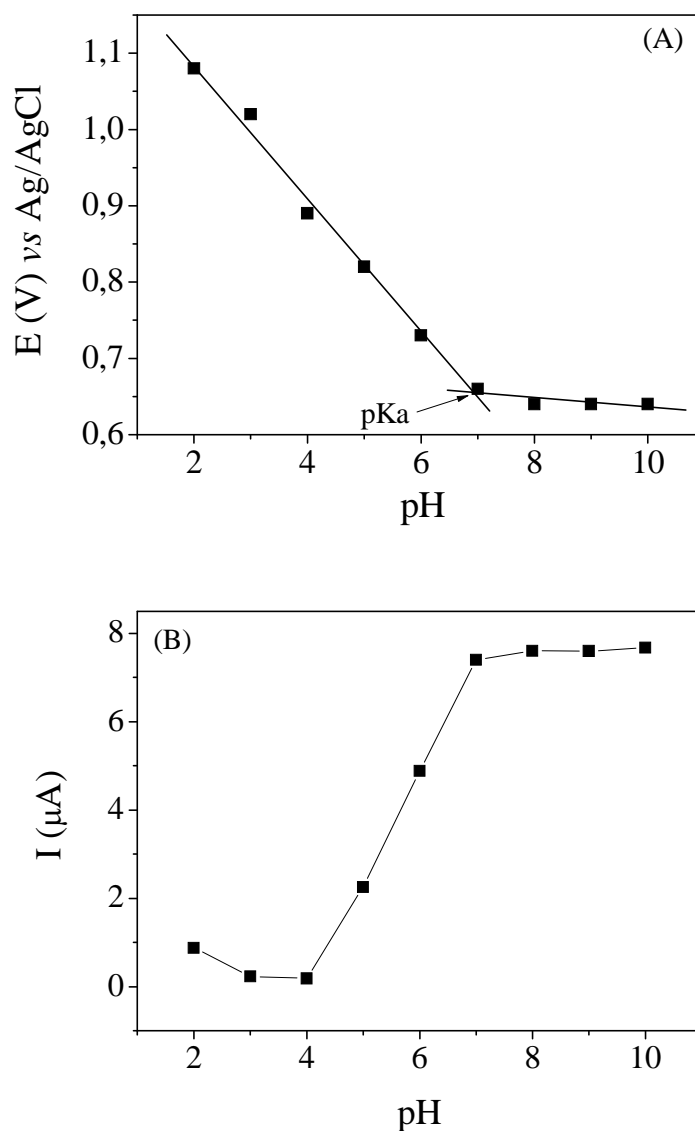
#### Efeito do eletrólito suporte e velocidade de varredura

O efeito do pH também foi investigado na oxidação do ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o

EDDB no intervalo de 2,0 a 10,0, cujos resultados são mostrados na Figura 3. Pela Figura 3A observa-se que o potencial de oxidação do ciclopirox é influenciado pela variação do pH do meio, no qual há um deslocamento de potencial para valores menos

positivos com o aumento do pH. Para valores de pH acima de 7,0, este parâmetro não influencia na resposta eletroquímica do ciclopirox no EDDB. Por este gráfico pode-se obter duas retas, cuja interseção em 6,96 corresponde ao pKa do ciclopirox, valor próximo ao encontrado na literatura que é de 6,84

[34]. Pela Figura 3B, observa-se que há uma queda na intensidade de corrente entre pH 2,0 e 4,0 e um aumento de intensidade da corrente de pH 4,0 a 7,0, onde permanece praticamente constante até pH 10,0, selecionando-se então o pH 7,0 para a determinação do ciclopirox.



**Figura 3.** Efeito do pH (a) no potencial de oxidação e (b) na intensidade de corrente de oxidação do ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o EDDB pré-tratado catódicamente.

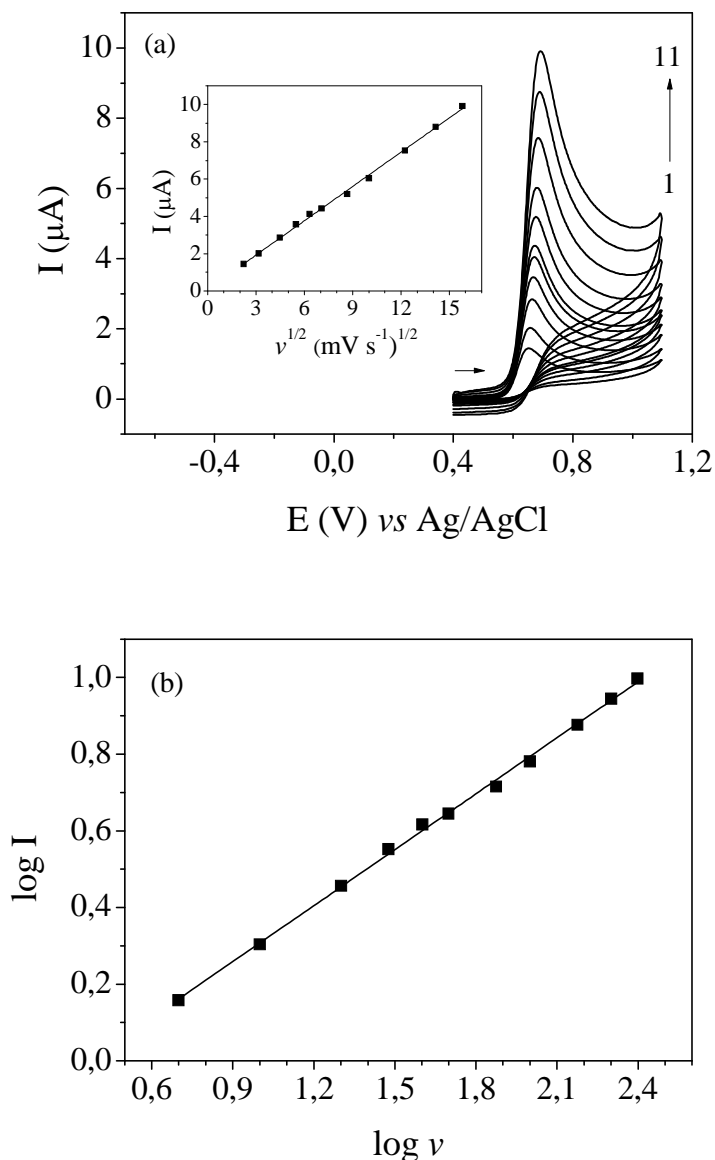
A dependência da corrente de pico anódico com a velocidade de varredura de potenciais (intervalo de 5 a  $250 \text{ mV s}^{-1}$ ) também foi investigada para a oxidação do ciclopirox (Figura 4(a)). Observa-se que a corrente de pico aumenta e desloca para valores de potenciais mais positivos com o aumento da velocidade, indicando irreversibilidade do sistema

[35]. A existência de uma linearidade entre as correntes de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $I_{pa} = 0,088 + 0,61 v^{1/2}$ ;  $r = 0,9978$ ) indica que na reação de oxidação do ciclopirox há predominância de um processo controlado por difusão. Além disso, esta linearidade indica comportamento típico de sistema irreversível,



não havendo etapas de reações químicas acopladas ao processo eletrodico. Adicionalmente, o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura

(Figura 4(b)) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,49, que está próximo do previsto na literatura (0,50) para processo controlado por difusão das espécies [35].



**Figura 4.** (a) Variação da velocidade de varredura nos voltamogramas do ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH 7,0): (1) 5, (2) 20, (3) 30, (4) 40, (5) 50, (6) 75, (7) 100, (8) 150, (9) 200, (10) 250  $\text{mV s}^{-1}$ . Inserido: Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (b) Dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o EDDB na presença de ciclopirox  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH 7,0).

De acordo com a teoria da VC para sistemas totalmente irreversíveis, o número de elétrons ( $n$ ) transferidos na eletro-oxidação do ciclopirox no EDDB também pode ser estimado pela equação:  $E_p/\log v = -30,0 \text{ mV}/an$  [36]. Pelo gráfico de  $E_p$  versus  $\log v$  foi obtida uma linearidade no intervalo de

velocidade de 5 a 250  $\text{mV s}^{-1}$ , com um valor de coeficiente angular de 24,8 mV. Assumindo  $\alpha = 0,5$ , estima-se que dois elétrons estão envolvidos na oxidação do ciclopirox na superfície do EDDB em tampão BR (pH 7,0), assim como obtido anteriormente.

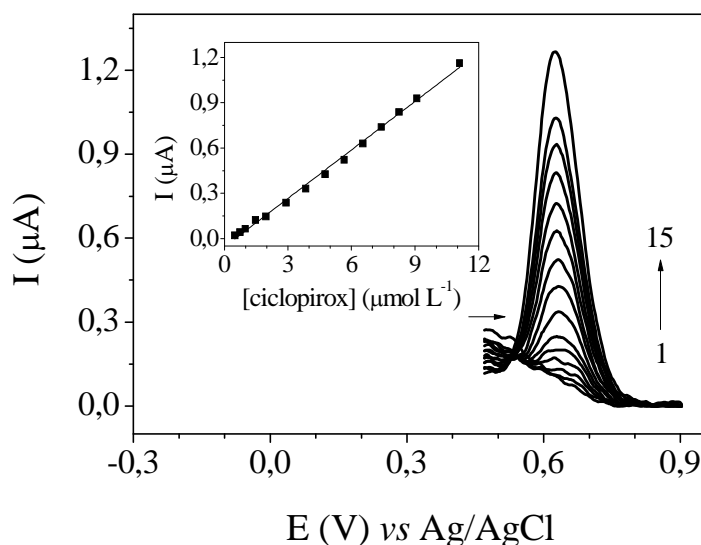
### Determinação de ciclopirox

A voltametria de onda quadrada foi utilizada para a determinação de ciclopirox em formulações farmacêuticas. Assim, os parâmetros instrumentais dessa técnica foram otimizados. Os valores investigados foram: 10 – 50 mV para amplitude de pulso ( $a$ ), 10 – 90 Hz para frequência e 1 – 5 mV para incremento de varredura ( $\Delta E_S$ ). Os valores otimizados foram  $a = 40$  mV,  $f = 50$  Hz e  $\Delta E_S = 4$  mV.

Após a otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de 0,47 a 0,90 V *vs.* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações de ciclopirox, de  $5,0 \times 10^{-7}$  a  $1,1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão BR (pH 7,0),

empregando-se o EDDB pré-tratado catodicamente.

A Figura 5 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada concentração de ciclopirox. Observa-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração do ciclopirox e que praticamente não ocorre deslocamento no valor dos potenciais de pico. A curva analítica está inserida na Figura 5 e a equação de reta obtida foi:  $I_{pa}/\mu A = 0,055 + 1,1 \times 10^4 c$ , com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9968. O limite de detecção obtido para o intervalo de concentração estudado foi de  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi de  $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.** Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de ciclopirox em tampão BR (pH 7,0) ( $a = 40$  mV,  $f = 50$  Hz e  $\Delta E_S = 4$  mV): (1) 0; (2)  $5,0 \times 10^{-7}$ ; (3)  $7,4 \times 10^{-7}$ ; (4)  $9,9 \times 10^{-7}$ ; (5)  $1,5 \times 10^{-6}$ ; (6)  $2,0 \times 10^{-6}$ ; (7)  $2,9 \times 10^{-6}$ ; (8)  $3,8 \times 10^{-6}$ ; (9)  $4,8 \times 10^{-6}$ ; (10)  $5,7 \times 10^{-6}$ ; (11)  $6,5 \times 10^{-5}$ ; (12)  $7,4 \times 10^{-6}$ ; (13)  $8,2 \times 10^{-6}$ ; (14)  $9,1 \times 10^{-6}$ ; (15)  $1,1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; inserido: Curva analítica.

A Tabela 1 apresenta a comparação dos parâmetros analíticos obtidos para a determinação de ciclopirox empregando o EDDB pré-tratado catodicamente com aqueles obtidos com diferentes eletrodos e/ou técnicas previamente descritos na literatura. Verifica-se que o LD obtido utilizando-se o EDDB foi menor que aqueles obtidos empregando o EGHg [11,12] ou o ECV (amperometria-FIA) [13] e igual aquele obtido pelo ECV (amperometria-BIA). Quando comparado ao ECV, o uso do EDDB possibilitou a determinação do ciclopirox em pH fisiológico, bem como em um menor potencial de

oxidação, no qual minimiza interferentes. Com relação ao eletrodo de mercúrio, o tempo de análise é menor utilizando o EDDB, visto a não há necessidade da desaeração das soluções, além do que tem se evitado o uso deste tipo de eletrodo na eletroanálise, devido a toxicidade do mercúrio.

O estudo da repetibilidade intra-dia foi feito em decuplicata ( $n = 10$ ) para a solução padrão de ciclopirox  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Para o estudo da repetibilidade inter-dia foram feitas 5 medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de ciclopirox  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Ambos os estudos

foram realizados por voltametria de onda quadrada. O desvio padrão relativo obtido para o estudo da repetibilidade intra-dia foi de 0,98 % e para a repetibilidade inter-dia de 3,8 %.

**Tabela 1.** Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes eletrodos e/ou técnicas para a determinação de ciclopirox

Eletrodo	Técnica	Linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )	Referência
EGHg	PPD	$9,6 \times 10^{-6} - 5,8 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$	[11]
EGHg	PPD	$9,6 \times 10^{-6} - 5,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	[12]
ECV	Amperometria-FIA	$2,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-7}$	[13]
ECV	Amperometria-BIA	$2,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-7}$	[13]
EDDB	SWV	$5,0 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-7}$	Este trabalho

#### Aplicação do procedimento voltamétrico proposto na determinação de amostras comerciais

O efeito de interferentes em potencial na determinação de ciclopirox em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais, como: álcool isopropílico, glicerol, polissorbato 80, metilparabeno, propilparabeno. Nesses experimentos, foi feita adição destes concomitantes à solução de ciclopirox  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de ciclopirox. Não foi observada diferença significativa entre os valores de corrente obtidas, indicando que o método pode ser aplicado para a quantificação do ciclopirox nas referidas amostras sem a interferência desses concomitantes, com boa exatidão.

O estudo de adição e recuperação do ciclopirox nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado, fornecendo informações sobre a influência de possíveis interferentes existentes na matriz das amostras contendo ciclopirox sobre o procedimento

proposto. As recuperações variaram entre 92,5 % a 106 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de ciclopirox pelo procedimento analítico proposto.

O método proposto foi aplicado na determinação de ciclopirox em amostras comerciais e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método potenciométrico descrito pela Farmacopeia Britânica. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Observa-se que os resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência. Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado. O valor de t calculado (0,1428) é menor que o valor de t crítico (12,706), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, no nível de confiança de 95%.

**Tabela 2.** Determinação de ciclopirox em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método potenciométrico.

Amostras	ciclopirox (mg/g ou mg/mL)			Erro relativo <sup>b</sup> (%)
	Rotulado	Referência <sup>a</sup>	Proposto <sup>a</sup>	
A (creme)	10	$10,3 \pm 0,9$	$10,7 \pm 0,6$	3,9
B (loção)	10	$10,5 \pm 0,6$	$10,2 \pm 0,7$	-2,9

<sup>a</sup>média aritmética de 3 medidas/amostra

<sup>b</sup>Erro relativo =  $[100 \times (\text{proposto} - \text{referência}) / \text{referência}]$

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados aqui reportados demonstram que o EDDB pré-tratado catodicamente em conjunto com a VOQ pode ser usado para a determinação de

ciclopirox em formulações farmacêuticas. Após a otimização dos parâmetros experimentais usando o tampão BR (pH 7,0), o LD encontrado foi de  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, obtendo-se também excelente repetibilidade intra-dia e inter-dia, com valores de desvio padrão

relativo de 0,98 % e 3,8 %, respectivamente. O método é vantajoso, quando comparado com os demais procedimentos eletroanalíticos descritos, com relação ao LD, potencial de oxidação, pH da solução de análise (pH fisiológico) e a não necessidade de desaeração da solução, que implica em menor tempo de análise. Ademais, o método proposto é simples, preciso, exato e de relativo baixo custo, podendo ser aplicado em laboratórios de análises de rotina.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem, em especial, ao Prof. Luiz Henrique Dall'Antonia pela disponibilização dos potenciostatos para as medidas eletroquímicas, a UEL, ao CNPq pelas bolsas de IC concedidas e também aos revisores, pelas críticas construtivas do manuscrito.

## 6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Gilman, A. G. *Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill: New York, 1996.
- [2] Ciclopirox, *British Pharmacopoeia*, HMSO: London, 1998.
- [3] Bisceglia, K. J.; Yu, J. T.; Coelhan, M.; Bouwer, E. J.; Roberts, A. L. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 558. [[CrossRef](#)]
- [4] Belliardo, F.; Bertolino, A.; Brandolo, G.; Lucarelli, C. *J. Chromatogr.* **1991**, *553*, 41. [[CrossRef](#)]
- [5] Lehr, K.-H.; Damm, P. *J. Chromatogr.* **1985**, *339*, 451. [[CrossRef](#)]
- [6] Gagliardi, L.; Multari, G.; Cavazzutti, G.; De Orsi, D.; Tonelli, D. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 2365. [[CrossRef](#)]
- [7] Escarrone, A. L. V.; Bittencourt, C. F.; Laporta, L. V.; dos Santos, M. R.; Primel, E. G.; Caldas, S. S. *Chromatographia* **2008**, *67*, 967. [[CrossRef](#)]
- [8] Li, J.; Jiang, Y.; Sun, T.; Ren, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 929. [[CrossRef](#)]
- [9] Felix, F. S.; do Lago, C. L.; Angnes, L. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 900. [[CrossRef](#)]
- [10] Walsh, M. I.; Rizk, M. S.; Eid, M. I.; Fathy, M. S. *Acta Pharm.* **2006**, *56*, 431.
- [11] Ibrahim, F.; El-Enany, N.; *Il Farmaco* **2003**, *58*, 1313. [[CrossRef](#)]
- [12] Ibrahim, F.; El-Enany, N. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32*, 353. [[CrossRef](#)]
- [13] Ferreira, L. M. C.; Felix, F. S.; Angnes, L. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 961. [[CrossRef](#)]
- [14] Pecková, K.; Musilová, J.; Berek, J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *39*, 148. [[CrossRef](#)]
- [15] Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 360. [[CrossRef](#)]
- [16] Batista, E. F.; Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1046. [[CrossRef](#)]
- [17] Sartori, E. R.; Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *Talanta* **2010**, *81*, 1418. [[CrossRef](#)]
- [18] Ardila, J. A.; Sartori, E. R.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *Talanta* **2013**, *103*, 201. [[CrossRef](#)]
- [19] Eisele, A. P. P.; Clausen, D. N.; Tarley, C. R. T.; Dall'Antonia, L. H.; Sartori, E. R. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 1734. [[CrossRef](#)]
- [20] Santos, M. C. G.; Tarley, C. R. T.; Dall'Antonia, L. H.; Sartori, E. R. *Sens. Act. B* **2013**, *188*, 263. [[CrossRef](#)]
- [21] Sartori, E. R.; Trench, A. B.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1504. [[CrossRef](#)]
- [22] Lopes, A. C. V.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Santos, A. S.; Franco, D. L.; Santos, W. T. P. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1800. [[CrossRef](#)]
- [23] Pleskov, Y. V. *J. Russ. Electrochem.* **2002**, *38*, 1275.
- [24] Compton, R. G.; Foord, J. S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1349. [[CrossRef](#)]
- [25] Hupert, M.; Muck, A.; Wang, R.; Stotter, J.; Cvackova, Z.; Haymond, S.; Show, Y.; Swain, G. M. *Diam. Relat. Mater.* **2003**, *12*, 1940. [[CrossRef](#)]
- [26] Yagi, I.; Notsu, H.; Kondo, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *473*, 173. [[CrossRef](#)]
- [27] Girard, H.; Simon, N.; Ballutaud, D.; Herlern, M.; Etcheberry, A. *Diamond Relat. Mater.* **2007**, *16*, 316. [[CrossRef](#)]
- [28] Suffredini, H. B.; Pedrosa, V. A.; Codognoto, L.; Machado, S. A. S.; Rocha-Filho, R. C.; Avaca, L. A. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 4021. [[CrossRef](#)]
- [29] Popa, E.; Notsu, H.; Miwa, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Electrochem. Solid-State Lett.* **1999**, *2*, 49. [[CrossRef](#)]
- [30] Salazar-Banda, G. R.; Andrade, L. S.; Nascente, P. A. P.; Pizani, P. S.; Rocha-Filho, R. C.; Avaca, L. A. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 4612. [[CrossRef](#)]
- [31] Gandini, D.; Michaud, P.; Duo, I.; Mache, E.; Haenni, W.; Perret, A.; Conminellis, C. *New Diamond Front. Carbon. Technol.* **1999**, *9*, 303. [[CrossRef](#)]
- [32] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [33] Li, C. *Colloids Surf. B* **2007**, *55*, 77. [[CrossRef](#)]
- [34] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01188>, acessado em 18/09/2013.
- [35] Gosser, D. K. *Cyclic Voltammetry*, VCH Publishers: New York, 1994.
- [36] Southampton Electrochemistry Group, *Instrumental methods in electrochemistry*, Ellis Horwood: Chichester, 1990.

## Theoretical Semi-empirical Study of the Glycine Molecule Interaction with Fullerene C<sub>60</sub>

Mohanned J. Al-Anber

Department of Physics, College of Science, Basrah University, Karmet Ali, Basrah, Iraq.

Article history: Received: 12 March 2013; revised: 10 July 2014; accepted: 19 August 2014. Available online: 21 September 2014.

**Abstract:** Modeling of the quantum interaction properties of glycine radicals on the fullerene C<sub>60</sub> are investigated by MINDO/3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap version 3) calculations. It is found that the interaction potential of the C-centered glycine radical with the fullerene C<sub>60</sub> lead to a stable complexes when it reacts with the carbon atom (C<sup>1</sup>-centered) and metastable conformations with N atoms. We have studied the effect of two rotations ( $\theta$  and  $\varphi$ ) characteristics of the fullerene C<sub>60</sub> on binding the amino acid. Our results suggest that the binding energy is lower as the glycine rotate increases, and as the carboxyl group rotate increases. Also the stability (binding energy) fluctuate decreases.

**Keywords:** amino acid; binding energy; fullerene; semi-empirical calculation

### 1. INTRODUCTION

Fullerenes is a molecule composed entirely of carbon, in the form of a hollow sphere, and are similar in structure to graphite, which is composed of stacked graphene sheets of linked hexagonal rings, but they may also contain pentagonal. The first fullerene to be discovered, and the family's namesake, buckminsterfullerene (C<sub>60</sub>), was prepared in 1985 by R. Smalley and co-workers at Rice University [1]. Fullerenes have since been found to occur in nature [2]. More recently, fullerenes have been detected in outer space and according to astronomer L. Stanghellini, "It's possible that Bucky balls from outer space provided seeds for life on Earth" [3, 4]. The characteristics and behavior of nanomaterials is a new field for science, being limited to nanoscale dimensions (1–100 nm). The nanostructures have a quantum nature due to their atomic and molecular size. Thus, the prediction and understanding of these nanomaterials must be based on experimental and theoretical research. A question is how the experiments can approach to the atomic level to do nanomeasurements? Because the fullerene C<sub>60</sub> has special thermal, mechanical, and electrical properties and the ability to be applied at atomic levels, it make them promising structures for working in a wide range of applications. Many of these applications are in

biology and potential medicinal use such as binding specific antibiotics to the structure to target resistant bacteria and even target certain cancer cells such as melanoma [5]. Fullerenes can be made to be absorbed by HeLa cells. Also the C<sub>60</sub> derivatives can be delivered to the cells by using the functional groups L-phenylalanine, folic acid, and L-arginine among others [6, 7]. There are few calculations that have been made using ab initio quantum methods applied to fullerenes. By DFT methods one can obtain IR, Raman and UV spectra. Results of such calculations can be compared with experimental results [8, 9]. In spite of the wide applications for fullerene C<sub>60</sub>, theoretical studies of the interaction mechanism with biomolecules are few. Where few researchers have studied the interaction of an amino acid with nanomaterials [10, 11].

In this work, we examine the interaction of four isomers of glycine radicals on the fullerene C<sub>60</sub>. Then we examine this interaction as a function of glycine rotate and then the carboxyl group. Finally, we tried to investigate the effect of linking another amino acid with fullerene on the interaction energy.

### 2. MATERIAL AND METHODS

Theoretical calculations can be used to bridge

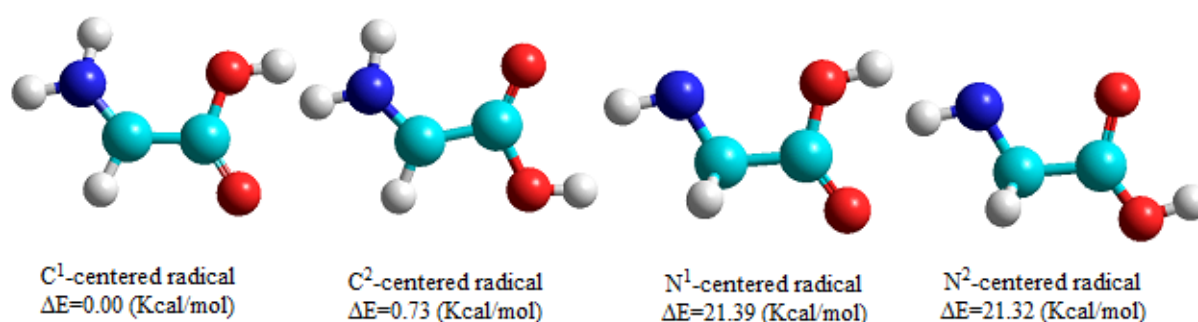
\*Corresponding author. E-mail: [mohanned.mohammed@uobasrah.edu.iq](mailto:mohanned.mohammed@uobasrah.edu.iq)

gaps in understanding experimental results. In many cases, the results of the experimental methods are unable to accurately describe small systems of complex biochemicals. The methods of molecular quantum mechanics can be used to investigate properties beyond the scope of current crystallographic methods. The molecular quantum techniques allow us to study optical, magnetic, and electronic properties that are not easily measured experimentally. Molecular quantum mechanics provides the interaction energies that are not provided by X-ray and NMR (nuclear magnetic resonance) experiments. The theoretical methods can be used to further investigate and to predict the physical and chemical nature of hydrogen bonding interactions. To investigate the structural and electronic properties of Fullerene molecules decorated with the glycine radicals, we used MINDO/3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap version 3). MINDO/3 is the earliest of the Dewar methods [12,13]. MINDO/3 provides more accurate geometries and heats of formation than CNDO or INDO, and has been used widely. The limitations of the INDO approximation, on which MINDO/3 is based, frequently lead to problems of accuracy when dealing with molecules containing heteroatoms. MINDO/3 is particularly good for describing carbocations, including non-classical carbocations, and polynitro organic compounds. For these reasons it gives better results than MNDO and AM1, even though those methods are generally more accurate. The problem that arises is how to perform an accurate calculation for a nano-sized system without ending in prohibitively large computations such as the DFT methods. The dangling bonds at the ends of the tubes were saturated by hydrogen atoms. The resolution of MINDO/3, as implemented in the HyperChem Release 7.52 for Windows Molecular Modeling System program package (<http://www.hyper.com/>),

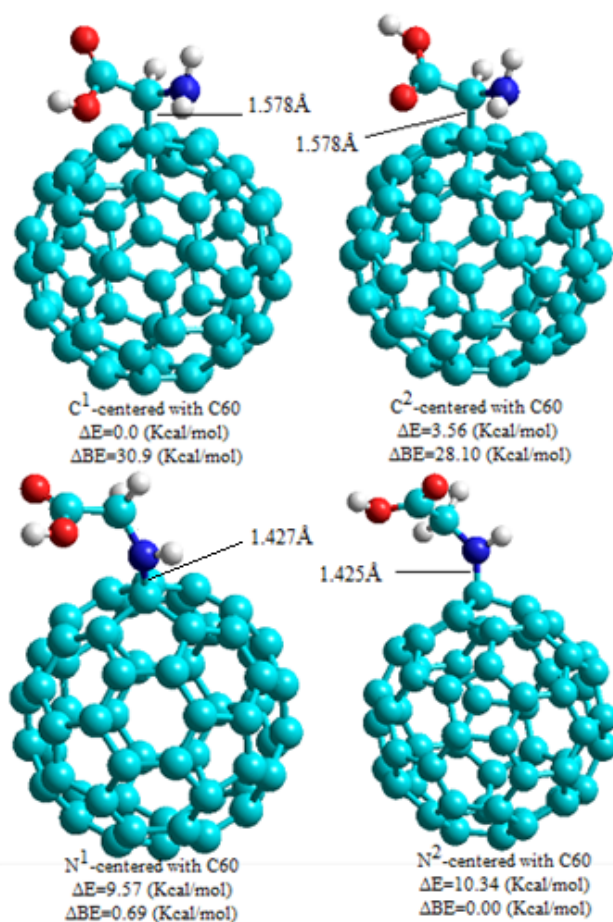
was employed for the geometry optimizations.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

For our investigation, it was important to determine the most stable isomers of the glycine radicals. Among the four possible isomers are the ones from which one hydrogen atom is abstracted from either the C atom, or the N atom (see Fig. 1). According to the relative stability,  $\Delta E$ , it was found that the C<sup>1</sup>-centered radical is favored over the C<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>, and N<sup>2</sup>-centered ones by 0.73, 21.39, and 21.32 kcal/mol, respectively, employing the MINDO/3 method, The C<sup>1</sup>-centered radical being favored over the N<sup>1</sup> and N<sup>2</sup>-centered radical isomer by 21.39 and 21.32 Kcal/mol respectively is in reasonable agreement with the values of 18.5 and 19.9 kcal/mol reported in other ab initio calculations [14, 15]. Also, the C<sup>1</sup>-centered radical is favored comparison with two others. Then, we calculated the interaction, binding energy (BE), of the four glycine radicals with fullerene molecules,  $BE = E_{\text{glycine+fullerene}} - (E_{\text{glycine}} + E_{\text{fullerene}})$ , where  $E_{\text{glycine+fullerene}}$  is the energy of the complex of glycine radical with fullerene C<sub>60</sub>,  $E_{\text{glycine}}$  is the energy of the glycine radical alone and  $E_{\text{fullerene}}$  is the energy of the fullerene C<sub>60</sub> alone. We found that upon reaction with the fullerene, the glycine radical forms stable complexes when the fullerene reacts with the carbon atom (C<sup>1</sup>-centered) and metastable conformations with the C<sup>2</sup>, N<sup>1</sup> and N<sup>2</sup> atoms, as shown in Fig. 2, along with their relative binding energies ( $\Delta BE$ ) and relative,  $\Delta E$  stabilities. The bond length, which connects between the glycine radical with fullerene C<sub>60</sub>, dependent on the centered, where the length of the bonds in issues of the two C-centered are longer than the two N-centered. The C<sup>1</sup>-centered radical has ability to connect with fullerenes in comparison with two others.



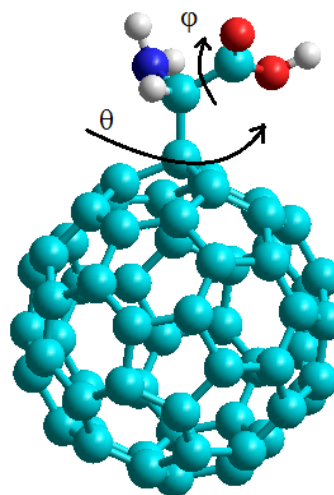
**Figure 1.** The isomers of the glycine radicals and their relative stability  $\Delta E$ .



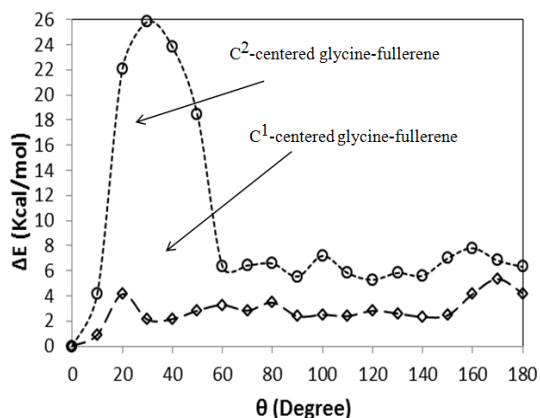
**Figure 2.** Geometry optimized structures of glycine radical–fullerene.

The first important factor is the examination of the interaction nature of the C<sup>1</sup>-centered and C<sup>2</sup>-centered radicals respectively with fullerene as a function of the rotations  $\theta$  with rotate step  $10^\circ$ , see Fig. 3. The effect of increases in the rotation angle,  $\theta$ , on the relative stability,  $\Delta E$ , of the C<sup>1</sup> and C<sup>2</sup>-centered glycine radicals respectively with fullerenes are shown in Fig. 4. An increasing in the radical's rotation about the bond that link it with the fullerene C<sub>60</sub> decrease in the relative stability of the C<sup>1</sup> and C<sup>2</sup>-centered glycine radicals with fullerene. This case shows the mechanism of lower binding between the amino acid and fullerene as the  $\theta$  increases. Generally, there are fluctuations in the relative stability with increase of  $\theta$ . The issues of rotating C<sup>2</sup>-centered glycine radical further lowers the stability, if that we compare that with the C<sup>1</sup>-centered glycine radical. In the issues of C<sup>2</sup>-centered glycine radical rotation,  $10^\circ < \theta < 60^\circ$ , there is repaid decreases in the stability, so that the probability of missing the bond of link between the C<sup>2</sup>-centered glycine radical with fullerene. The energy that must be used to rotate the C<sup>1</sup>-centered glycine radical is not high enough, so that this rotation may occur. The second important factor is

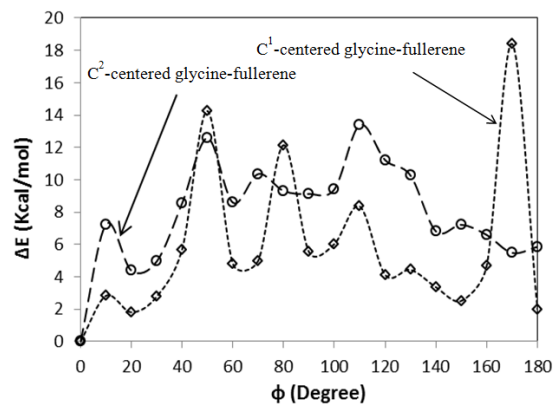
the interaction of the C<sup>1</sup>-centered and C<sup>2</sup>-centered radicals respectively with fullerene as a function of the carboxyl group rotate,  $\phi$ , with rotating step  $10^\circ$  see Fig. 3.



**Figure 3.** Displays the direction of glycine radical rotation about the bond that link glycine radical with fullerene,  $\theta$ , and the rotation of carboxyl group,  $\phi$ , respectively.



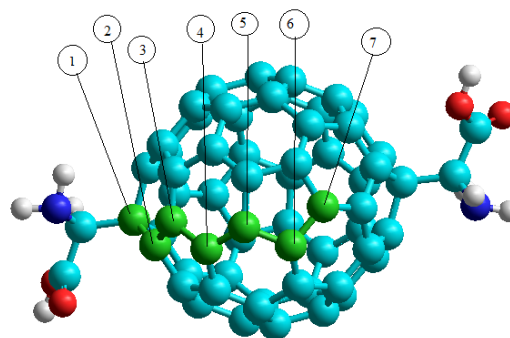
**Figure 4.** The relative stability,  $\Delta E$ , of the C1 and C2-centered glycine radicals respectively with fullerenes as a function of the rotation angle,  $\theta$ .



**Figure 5.** The relative stability,  $\Delta E$ , of the C1 and C2-centered glycine radicals respectively with fullerenes as a function of the rotation angle,  $\phi$ .

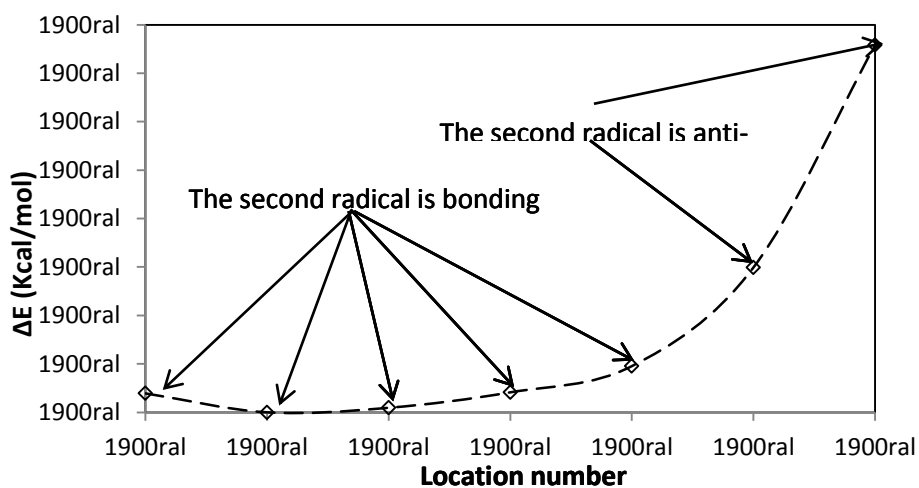
The effect of increases in the carboxyl group rotation angle,  $\phi$ , on the relative stability,  $\Delta E$ , of the C<sup>1</sup> and C<sup>2</sup>-centered glycine radicals respectively with fullerenes are shown in Fig. 5. An increase in the radical's rotation about the bond that links it with fullerene decreases in the relative stability of the complex. The rotating of carboxyl group shows wide fluctuations in the relative stability comparison with effects of  $\theta$  angle. In spite of the carboxyl group rotate in issue of C<sup>2</sup>-centered have higher effect as in  $\theta$  rotates, but there are two rotate angles,  $\phi=50^\circ$  and  $\phi=170^\circ$ , for C<sup>1</sup>-centered have the highest effects on the relative stability.

In order to examine the relative stability of the system, when there are two radicals of glycine that linked with fullerene C<sub>60</sub>, see Fig. 6, where the numbers 1, 2, ..., 7 show the locations of linking the second radical of glycine with still the first radical in same position.



**Figure 6.** Shows the locations of linking the second radical of glycine with fullerenes, so still the first radical in same position.

Fig. 7 shows the results of relative stability as a function of the change the second radical locations on the surface of fullerene. Where, the position 2 is the best location to link the second radical of glycine.



**Figure 7.** The results of relative stability as a function of the change the second radical locations on the surface of fullerene.



The stability decreases to become critical at positions 6 and 7, where the second radical becomes nonbonding. The fullerene C<sub>60</sub> may be able to make more than one linked with the radicals of glycine in comparison with the carbon nanotubes CNTs [11]. The carbon nanotubes CNTs can make one linking with radical of glycine compared with the fullerene C<sub>60</sub>, which has got more than one linking. The thermal energy at RT equal ~ 0.5 Kcal/mol, so that the second glycine radical may can move on the surface of fullerene C<sub>60</sub> between the positions 1,2,3 and 4.

#### 4. CONCLUSION

We have performed MINDO/3 calculations on the structural properties of fullerene C<sub>60</sub> upon adsorption of various glycine radicals. Among these four isomers, the C<sup>1</sup>-centered glycine radical forms stable complexes with fullerene. The results of the rotation ( $\theta$  and  $\phi$ ) on the relative stability of glycine-fullerene show a decrease as rotates increases. It is possible to link two of glycine radicals on the fullerene surfaces.

#### 5. REFERENCE AND NOTES

- [1] Iijima, S. *J. Cryst. Growth* **1980**, *50*, 675. [[CrossRef](#)]
- [2] Buseck, P. R.; Tsipursky, S. J.; Hettich, R. *Science* **1992**, *257*, 215. [[CrossRef](#)]
- [3] Cami, J.; Bernard-Salas, J.; Peeters, E.; Malek, S. E. *Science* **2010**, *329*, 1180. [[CrossRef](#)]
- [4] García-Hernández, D. A.; Manchado, A.; García-Lario, P.; Stanghellini, L.; Villaver, E.; Shaw, R. A.; Szczerba, R.; Perea-Calderón, J. V. *Astrophys. J., Lett.* **2010**, *724*, L39. [[CrossRef](#)]
- [5] Tegos, G. P.; Demidova, T. N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M. R. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1127. [[CrossRef](#)]
- [6] Brown, S. B. *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 497. [[CrossRef](#)]
- [7] Mroz, P. *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *43*, 711. [[CrossRef](#)]
- [8] Jalbouta, A. F.; Hameedb, A. J.; Jimenez-Fabiana, I.; Ibrahimc, M.; de Leona, A. *J. Organometallic Chem.* **2008**, *693*, 216. [[CrossRef](#)]
- [9] Arndt, M.; Nairz, O.; Vos-Andreae, J.; Keller, C.; van der Zouw, G.; Zeilinger, A. *Nature* **1999**, *401*, 680. [[CrossRef](#)]
- [10] Mavrandonakis, A.; Froudakis, G. E.; Farantos, S. C. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2006**, *11*, 88. [[Link](#)]
- [11] Al-Anber, M. J. *J. Macromol. Sci., Part B: Phys.* **2011**, *50*, 2481. [[CrossRef](#)]
- [12] Baird, N. C.; Dewar, M. J. S. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 1262. [[CrossRef](#)]
- [13] Bingham, R. C.; Dewar, M. J. S.; Lo, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1285. [[CrossRef](#)]
- [14] Huang, Y.; Guler, L.; Heidbrink, J.; Kenttamaa, H. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3973. [[CrossRef](#)]
- [15] Yu, D.; Rauk, A.; Armstrong, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1789. [[CrossRef](#)]

## Determinação Eletroanalítica da Danofloxacina em Amostras Biológicas Utilizando Voltametria de Onda Quadrada

Chirley Vanessa Boone, Magno A. G. Trindade, Claudio T. Carvalho, Adriana E. Carvalho\*

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, CEP 79804-970, Dourados – MS, Brasil.

Article history: Received: 07 March 2014; revised: 20 August 2014; accepted: 20 August 2014. Available online: 23 September 2014.

**Abstract:** The voltammetric behavior of danofloxacin (DFX) has been studied, in aqueous solution, on a glassy carbon electrode using square wave voltammetry (SWV) as electroanalytical technique. After optimization of the experimental conditions, DFX was analyzed in spiked biologic samples using a Britton-Robinson buffer with pH = 5.0 as the supporting electrolyte. Oxidation occurs at 0.98 V vs. Ag/AgCl in a two-electron process controlled by adsorption of the electrogenerated products on the electrode surface. An acceptable recovery was obtained for assay of spiked biologic samples, with value of 98.7% for the swine urine and 95.3 % for the bovine urine.

**Keywords:** danofloxacin; square wave voltammetry; electroanalysis; biological samples

### 1. INTRODUÇÃO

As quinolonas surgiram como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, a cloroquina. A substância foi descoberta no ano de 1962 por George Leshner e colaboradores em uma destilação, durante a síntese da cloroquina. Este produto secundário revelou possuir atividade antimicrobiana, o qual deu origem a primeira quinolona: o Ácido Nalidíxico [1]. Por volta das décadas de 70 e 80, foram realizados intensos estudos a partir das primeiras quinolonas, o que originaram nas chamadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas [2]. A Danofloxacina (DFX, Fig. 1), por exemplo, é uma quinolona de segunda geração, de uso exclusivo para bovinos e suínos [3], possui substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor na posição 6 e a introdução de um grupo peperazinil na posição 7. Estas modificações promovem maior atividade antibacteriana, como por exemplo, maior eficiência contra a *Pseudomonasaeruginosa* e *Coccus* Gram positivas. A melhoria na eficácia desses compostos é atribuída a maior absorção por via oral e melhor distribuição pelos tecidos [4].

Para assegurar a eficácia da danofloxacina, altas dosagens são administradas. Sendo que grande quantidade é excretada pelo ser vivo na forma

inalterada, a danofloxacina, elimina aproximadamente 38% na urina em bovinos e 43% em urina suína [6]. O uso desenfreado de antibióticos em geral, acarreta dois problemas ambientais: um, é a contaminação dos recursos hídricos e outro, é que alguns microrganismos criam resistência a esses fármacos. As bactérias podem fazer frequentemente mudanças em seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos [7]. Devido aos fatores citados, o desenvolvimento de técnicas adequadas à quantificação de analitos, limites de detecção obtidos e o custo da análise são aspectos particularmente importantes.

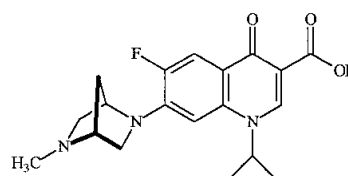


Figura 1. Estrutura da danofloxacina [5].

As análises contendo essas fluoroquinolonas são tradicionalmente realizadas recorrendo-se às técnicas cromatográficas, interessantes devido à capacidade de efetuar separações, identificar e quantificar as espécies em uma amostra utilizando diferentes detectores, e aos limites de detecção

\*Corresponding author. E-mail: [adrianacarvalho@ufgd.edu.br](mailto:adrianacarvalho@ufgd.edu.br)

apropriados. Contudo, as técnicas cromatográficas exigem processos de separação em amostras complexas, utilizam maior quantidade de reagentes e uma instrumentação muitas vezes cara, tudo isso contribui para análises mais demoradas e de maior custo, com alta geração de resíduos químicos [8].

Um método mais simples, barato e que não requer complicados tratamentos da amostra são utilizando técnicas voltamétricas, alguns trabalhos na literatura relatam a determinação de algumas fluoroquinolonas utilizando essas técnicas, algumas delas são: moxifloxacinina [9], norfloxacinina [10, 11], perfloxacinina [12], levofloxacinina [13], ofloxacinina [14], enrofloxacinina [15].

Para a danofloxacinina encontrou-se apenas dois trabalhos envolvendo estudos voltamétricos, sendo que um deles foi realizado a determinação eletroquímica do fármaco por voltametria de pulso diferencial [16] e outro trabalho sobre determinação analítica dos antibacterianos danofloxacinina e orbifloxacinina utilizando voltametria cíclica e de pulso diferencial catódica adsorptiva em urina humana e soro sanguíneo [17], ambos os trabalhos, o eletrodo de gota pendente de mercúrio foi empregado como eletrodo de trabalho. Sendo que a utilização deste eletrodo apresenta algumas desvantagens ao que se refere à faixa de trabalho na região anódica é estreita e a elevada toxicidade do metal. Os eletrodos sólidos, como o eletrodo de carbono vítreo (ECV) apresentam janelas de potenciais mais amplos, facilidade e simplicidade de operação.

O desenvolvimento de metodologias analíticas que proporcionam rapidez, sensibilidade e sendo desnecessários pré-tratamentos demorados da amostra em estudo, são fatores de mérito a ser avaliada em uma metodologia analítica. Nessas circunstâncias a voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis, com limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo [18]. Tendo em vista os fatores mencionados, desenvolveu-se metodologia analítica para determinação da danofloxacinina em matrizes biológicas complexas utilizando a técnica de VOQ com eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução estoque de danofloxacinina (Sigma-Aldrich) na concentração de  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> com água deionizada. O eletrólito suporte utilizado foi o tampão Britton Robinson (BR) na concentração de 0,04 mol L<sup>-1</sup>, preparado pela mistura de soluções de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 0,04 mol L<sup>-1</sup>, ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) 0,04 mol L<sup>-1</sup>, ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,04 mol L<sup>-1</sup>. As soluções tiveram o pH ajustado quando necessário com NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>, todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

### Preparo das amostras de urina

As amostras de urina bovina e suína foram coletadas e em seguida armazenadas em geladeira. Preparou-se soluções contendo 75,25 mg L<sup>-1</sup> e 63,00 mg L<sup>-1</sup> de danofloxacinina para as amostras de urina bovina e suína, respectivamente. Antes da construção da curva de adição de padrão, centrifugaram-se as amostras com 20% de metanol de grau analítico, para precipitação de possíveis proteínas presentes, retirando-se o sobrenadante para a realização da curva analítica. A quantidade de amostra de urina adicionada a célula eletroquímica foi próxima ao limite de quantificação determinado pela curva de calibração.

### Instrumentação

Para as medidas eletroquímicas utilizou-se o tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado com solução NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> e 2,5% de metanol na célula eletroquímica para melhorar a solubilidade do analito.

As curvas analíticas foram obtidas pelo método de adição de padrão. As medidas foram realizadas em triplicata.

A célula eletroquímica utilizada foi uma célula convencional de compartimento único e orifícios para encaixe dos eletrodos. Como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo com área aproximada de 0,10 cm<sup>2</sup>; eletrodo de referência utilizado foi Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> e como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio espiralado de platina.

Para realização das medidas eletroquímicas utilizou-se o bipotenciostato/galvanostato portátil  $\mu$ STAT 400 (DropSens) controlado por um

computador, usando o software DropView.

Para as medidas de absorção molecular foi utilizado um espectrofotômetro Cary 50 UV/VIS (Varian) que tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de xenônio, um monocromador Czerny-Turner 0,25 m e um detector de diodo de Si. Para obtenção dos espectros de varredura foi utilizada uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

### Determinação da danofloxacina por espectrofotometria de UV/VIS

A técnica de espectrofotometria de UV/Vis, técnica oficial de determinação desse fármaco [19], foi utilizada como técnica comparativa, sendo construídas as curvas de adição de padrão avaliando a absorbância nesse comprimento de onda. Todas as soluções foram preparadas em 50:50 v/v água/metanol para ser utilizada no espectrofotometro, sendo este o meio em que a danofloxacina apresenta (visivelmente) maior solubilidade.

## 3. RESULTADOS DISCUSSÃO

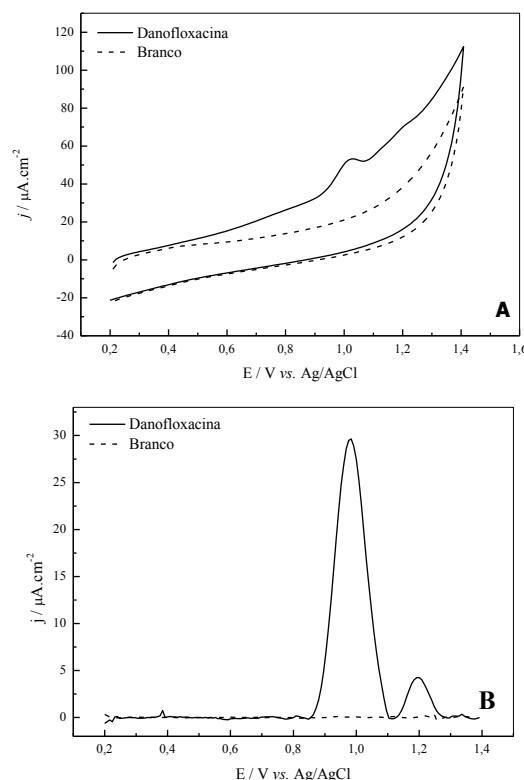
### Otimização dos parâmetros experimentais

A técnica de voltametria cíclica foi empregada como estudo inicial da danofloxacina, para avaliar a eletroatividade da substância, determinar se alguma espécie, em solução, pode ser oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. Para este estudo, a faixa de potencial de trabalho utilizada foi de 0,2 V a 1,4 V. A Figura 2-A mostra o voltamograma cíclico com os estudos iniciais sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que em potenciais próximos de 1,0 V vs. Ag/AgCl apresentou um processo de oxidação, um pico de pequena intensidade como é mostrado na Figura 2-A. Pode-se observar que o sistema é irreversível, uma vez que não apresenta pico de redução.

Tendo esse resultado, fez-se o estudo em VOQ, pois a técnica é mais sensível, observa-se pela Figura 2-B um voltamograma de onda quadrada obtido com concentração aproximadamente 6 vezes menor, e que apresentou maior intensidade de suporte proporcionou o deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos e também uma diminuição na densidade de corrente de pico.

densidade de corrente de pico, devido a esse fato estudaram-se melhores condições para a determinação do fármaco danofloxacina.

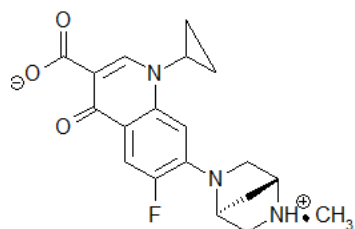


**Figura 2. A:** Voltamogramas cíclicos de Danofloxacina  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  dissolvido no eletrólito tampão BR (pH 5,00) com  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , 2,5% de metanol,  $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de surfactante lauril sulfato de sódio. **B:** Voltamograma de onda quadrada para detecção da danofloxacina  $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em eletrólito suporte BR (pH 5,00), 2,5% de metanol,  $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de surfactante lauril sulfato de sódio,  $t_{eq} = 10 \text{ s}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $f = 20 \text{ Hz}$  e  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ , intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$ .

Um passo importante no desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica é a otimização dos parâmetros que possam influenciar na resposta voltamétrica. Para isto foi realizado um estudo de influência do pH do meio e dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (VOQ), como frequência da onda quadrada ( $f$ ), amplitude da onda quadrada ( $a$ ) e incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ), buscando, desta forma, o melhor sinal analítico.

O comportamento voltamétrico da danofloxacina é marcadamente influenciado pelo pH do eletrólito suporte, este efeito é ilustrado através dos valores de densidades de corrente e potencial de pico (dados não mostrados). O aumento do pH do eletrólito Variando o  $E_p$  em função do pH, obteve-se duas retas cuja intersecção em pH 6,4 corresponde ao  $pK_a$  da danofloxacina, nesse  $pK_a$  aproximadamente 55,14%

das moléculas de danofloxacina estão na seguinte forma apresentada na figura 3[18].



**Figura 3.** Estrutura da danofloxacina em pH 6,4 [19].

Do ponto de vista analítico, a resposta da  $j_p$  (densidade de corrente de pico) e do  $E_p$  (potencial de pico) em relação ao pH do eletrólito suporte, foi estudada de forma a otimizar um valor adequado para o desenvolvimento da metodologia de análise da danofloxacina. A  $j_p$  apresentou maior valor em pH 5,0, além disso, o pico de oxidação da danofloxacina neste pH também apresentou boa resolução, portanto, este valor foi adotado para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

As medidas realizadas com os diferentes surfactantes; aniônico: lauril sulfato de sódio, catiônico: cloreto tetraetil amônio e não iônico: brij 30 (dados não mostrados), dentre os surfactantes analisados, o lauril sulfato de sódio foi o que apresentou maior ganho de corrente (aproximadamente 20% em relação a outros surfactantes e cerca de 90% com relação a não utilização de surfactante). Os surfactantes são utilizados para suprimir a perda da atividade de eletrodos sólidos pela adsorção. A utilização do surfactante pode alterar parâmetros como corrente de pico, potencial de pico, potencial de meio pico entre outros [20,21]. A concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  do surfactante lauril sulfato de sódio foi escolhida como a melhor concentração a ser utilizada, pois apresentou uma melhor separação entre os dois picos da danofloxacina e um melhor desvio padrão da densidade de corrente de pico, o valor do potencial está em 1,04 V, e com o aumento da concentração de surfactante obteve-se um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas, o que não torna vantajoso a utilização de concentrações maiores.

A frequência de aplicação de pulsos de potencial ( $f$ ) é um parâmetro importante na VOQ, pois melhora a sensibilidade e possibilita observar o tipo de processo e o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica [18]. Neste estudo observa-se

que, com o aumento no valor da frequência de aplicação de pulsos de potenciais ocorre também um aumento proporcional na intensidade de densidade de corrente de pico e um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivas.

Porém, com o aumento da frequência, há também um deslocamento da linha base para valores maiores de correntes. Portanto, a frequência selecionada foi de 20 Hz, evitando assim altos valores de correntes na linha base.

De acordo com os critérios da voltametria de onda quadrada, a dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da frequência para reações totalmente irreversíveis com reagentes e/ou produtos adsorvidos é linear e apresenta uma inclinação de [22]:

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = -\frac{2,3 RT}{\alpha n F} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que:  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica e  $n$  o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica. O comportamento linear do potencial de pico em função do logaritmo de frequência, para a danofloxacina com inclinação de 0,06485 e aplicando a equação acima se obteve um  $\alpha n = 0,91$ , se considerarmos  $\alpha = 0,5$  valor comumente utilizado, então, dois elétrons por molécula de danofloxacina envolvidos no processo de oxidação.

Outro parâmetro também avaliado na oxidação da danofloxacina foi a influência da amplitude de aplicação de pulso de potencial ( $a$ ) na  $j_p$ . Os resultados obtidos mostraram que, para valores de amplitude menores que 40 mV, o aumento de intensidade de corrente é linear, a partir deste valor observa-se decréscimo na densidade de corrente de pico. No entanto, a amplitude de 20 mV foi selecionada para prosseguir com os demais estudos, pois em amplitudes maiores observa-se um aumento da corrente residual, o que prejudicaria as posteriores medidas.

Na voltametria de onda quadrada, a velocidade efetiva é o resultado do produto de frequência de aplicação de pulsos de potencial ( $f$ ) pelo incremento de varredura de potencial ( $\Delta E_s$ ). Deste modo, um incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido e melhorar a sensibilidade do método [18]. Entretanto, uma melhor definição de  $j_p$  é obtida até 8 mV, em valores maiores de incremento de potencial a densidade de corrente pico não aumenta significativamente e nota-se um alargamento do pico de oxidação em  $\Delta E_s$ , maiores que 8 mV.

Os parâmetros otimizados, bem como os demais utilizados no desenvolvimento desta metodologia são apresentados a seguir (Tabela 1):

**Tabela 1.** Parâmetros selecionados para a análise de DFX empregando a metodologia eletroanalítica e o eletrodo de carbono vítreo sob a técnica de VOQ.

Parâmetros	Parâmetro selecionado
Britton Robinson 0,04 mol L <sup>-1</sup>	pH 5,0
Surfactante	Lauril sulfato de sódio
Concentração do surfactante	4,0 μ mol L <sup>-1</sup>
Frequência do pulso	20 Hz
Amplitude do pulso	20 mV
Incremento de potencial	8 mV

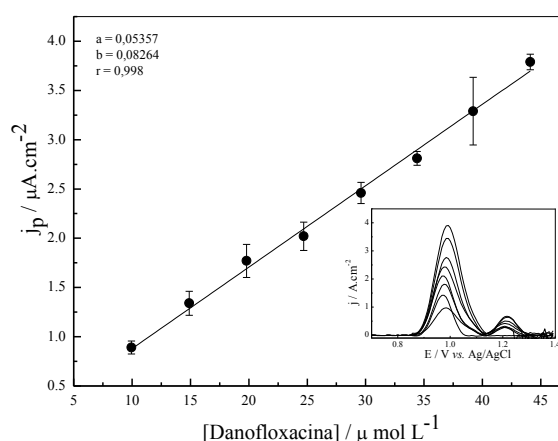
### Curva analítica para a danofloxacina

Utilizando as condições de trabalho previamente otimizadas, foram realizados estudos em diferentes concentrações de Danofloxacina, monitorando-se o pico de oxidação eletroquímica deste composto. Na Figura 3 são apresentados os voltamogramas e a curva obtida em diferentes concentrações, no intervalo de  $9,95 \times 10^{-6}$  a  $4,41 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. As curvas foram construídas empregando o método da adição de padrão, neste procedimento, alíquotas da solução estoque do analito de concentração conhecida foram adicionadas à célula eletroquímica e, imediatamente após cada adição, um voltamograma foi obtido. Em seguida foi verificada a correlação entre intensidade da densidade de corrente de pico e concentração de danofloxacina.

A relação matemática proveniente da correlação é chamada de curva de calibração. Na prática, uma curva analítica pode ser construída por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido aos possíveis erros associados [23]. A equação que representa a curva analítica foi calculada empregando o método dos mínimos quadrados, que por sua vez, visa obter a melhor reta, ou seja, aquela que passa através de um conjunto de pontos que apresentam alguma dispersão e não estão perfeitamente localizados sobre uma linha reta [24].

A partir da Figura 4 pode-se observar um aumento da corrente de pico em função da concentração e que não houve deslocamento dos potenciais de pico existe. Este comportamento se deve ao aumento da quantidade de espécies eletroativas em torno da superfície do eletrodo possibilitando que mais moléculas possam ser oxidadas. A Figura 4 apresenta a curva analítica com os valores médios ( $n = 3$ ) e com os respectivos desvios padrão para cada ponto da curva obtida para danofloxacina sobre eletrodo de carbono vítreo.

A inserção da Figura 4 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de danofloxacina.



**Figura 4.** Curva analítica para danofloxacina em BR pH 5,0 com concentrações variando de  $9,95 \times 10^{-6}$  a  $4,41 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>,  $f = 20$  Hz,  $a = 20$  mV,  $\Delta E_s = 8$  mV e  $t_{eq} = 10$  s. Inserção: Voltamogramas de onda quadrada para DFX em diferentes concentrações.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Para a determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) utilizou-se as seguintes equações [23]:

$$LD = \frac{3xS_b}{s} \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = \frac{10xS_b}{s} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde,  $S_b$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, do coeficiente linear da equação e  $s$  é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) representa a

menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

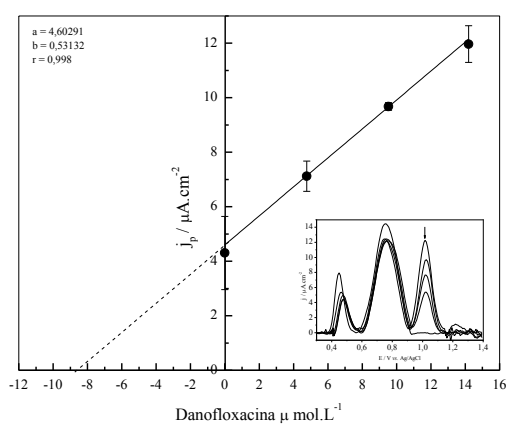
Os valores encontrados na curva analítica são mostrados na Tabela 3 a seguir.

**Tabela 2.** Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas obtidos na determinação de danofloxacina empregando VOQ.

Parâmetros	Valores encontrados
Faixa de linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	9,95 x 10 <sup>-6</sup> a 4,41 x 10 <sup>-5</sup>
Equação da curva	$j_p(A) = 0,05357 + 0,08264[DFX]$
r	0,998
LD (mol L <sup>-1</sup> )	2,47 x 10 <sup>-6</sup>
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	8,26 x 10 <sup>-6</sup>

### Determinação da danofloxacina em amostra de urina bovina

Os voltamogramas e a curva com o método de adição de padrão em amostra de urina bovina são mostrados na Figura 5. Conforme apresentado, o pico da danofloxacina está presente em aproximadamente 1,0 V, o aumento do pico é devido à sucessiva adição do padrão danofloxacina.



**Figura 5.** Relação entre densidade de corrente de pico e concentração de DFX para curva de adição de padrão em urina bovina. Inserção: VOQ obtidos para as concentrações de  $4,77 \times 10^{-6}$  a  $14,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> do padrão em BR pH 5,0 com  $t_{eq} = 10$  s,  $f = 20$  Hz,  $a = 20$  mV e  $\Delta E_s = 8$  mV.

A Tabela 3 apresenta os dados da duplicata obtidos por voltametria de onda quadrada obtidos em amostras de urina bovina.

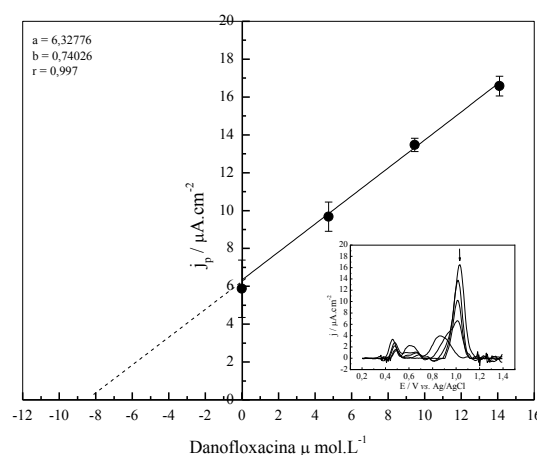
**Tabela 3.** Resultados de recuperação para Danofloxacina em amostra de urina bovina obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.

Replicata	[DFX] μ mol L <sup>-1</sup>		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada	
1		8,66	92,8
2	9,33	9,13	97,8
Média		8,89±0,33	95,3

A partir dos resultados obtidos observa-se a boa recuperação obtida para as amostras reais de urina, como apresentado na inserção da Figura 5, os dois primeiros picos possivelmente se devem a presença de aminoácidos e ácido úrico contido na urina. No terceiro pico (danofloxacina) em aproximadamente 0,98 V observa-se o aumento da corrente de pico com o aumento da concentração do padrão.

### Determinação da danofloxacina em amostra de urina suína

Os voltamogramas e a curva com o método de adição de padrão em amostra de urina suína são mostrados na Figura 6. Onde o pico da danofloxacina está presente em aproximadamente 1,0 V, observa-se nessa faixa de potencial o aumento do pico com a sucessiva adição do padrão danofloxacina.



**Figura 6:** Relação entre corrente de pico e concentração de DFX para curva de adição de padrão em urina suína. Inserção: VOQ obtidos para as concentrações de  $4,77 \times 10^{-6}$  a  $14,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> do padrão em BR pH 5,0 com  $t_{eq} = 10$  s,  $f = 20$  Hz,  $a = 20$  mV e  $\Delta E_s = 8$  mV.

A Tabela 4 apresenta os dados da duplicata obtidos por voltametria de onda quadrada obtidos em amostras de urina suína.

**Tabela 4.** Resultados de recuperação para danofloxacin em amostra de urina suína obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.

Replicata	[DFX] $10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup>		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada	
1		8,55	98,6
2	8,67	8,57	98,8
Média		8,56±0,014	98,7

A partir dos resultados observa-se a boa recuperação obtida para as amostras reais de urina, como apresentado na inserção da Figura 6, os dois primeiros picos possivelmente se devem a presença de aminoácidos e ácido úrico contido na urina. No branco observa-se um pico alargado (aproximadamente 0,88 V), que não tem efeito pronunciado conforme há aumento da concentração do padrão, fato este que não prejudicou a detecção do medicamento, observa-se também que o pico resultante da danofloxacin está em potenciais mais positivos, ou seja, com a adição da urina deslocou o potencial de oxidação do antibiótico, de 0,98V para 1,03.

**Tabela 5.** Parâmetros obtidos da curva analítica obtida por espectrofotometria de UV/VIS na detecção da danofloxacin.

Parâmetros	Valores encontrados
Faixa de linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	$1 \times 10^{-8}$ a $1 \times 10^{-5}$
Equação da curva	$\Delta A = 0,01124 + 45678,51 [\text{dano}]$
r	0,99977
LD (mol L <sup>-1</sup> )	$1,46 \times 10^{-7}$
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	$4,83 \times 10^{-7}$

A Tabela 6 a seguir apresenta os diferentes LD e LQ obtidos em outras técnicas conhecidas e aplicadas o estudo das fluoroquinolonas em geral.

Através da tabela observamos que os LD encontrados para a técnica aqui desenvolvida não apresenta valores tão baixos quanto aos das outras

### Determinação da danofloxacin por espectrofotometria de UV/VIS

A determinação analítica de DFX por UV/VIS foi realizado como comparação à técnica eletroquímica proposta. A curva analítica obtida por espectrofotometria de UV/VIS, o maior pico de absorção (não mostrados) se deu em comprimento de onda ( $\lambda$ ) 279 nm sendo este o valor de absorção medido para a construção da curva analítica.

### Determinação espectrofotométrica da danofloxacin em meio de urina bovina

Na análise em meio de urina bovina apresentou uma elevada recuperação (267,58%) da danofloxacin, que pode ser explicada por erros de leitura do equipamento, já que o meio de urina pode ser considerado uma matriz complexa, estando assim mais vulnerável a erros associados a composição da matriz. Já para a determinação em matriz de urina suína apresentou recuperação de 80,68%, que concorda com os resultados obtidos por voltametria de onda quadrada, pois em urina suína apresentou melhores resultados em comparação a matriz de urina bovina.

técnicas apresentadas, mas as demais técnicas apresentam demorados e custosos preparo de amostra quando se refere a determinação em amostra real, o que não é evidenciado na VOQ, onde com um simples procedimento de limpeza obtivemos bons resultados de recuperação.

**Tabela 6.** Comparação de diferentes técnicas para determinação de algumas fluoroquinolonas.

Parâmetros	Fármaco	LD $\mu\text{g mL}^{-1}$	Referência
Voltametria de Onda Quadrada	danofloxacin	0,88	Neste trabalho
Espectrofotometria de UV/VIS	danofloxacin	0,052	Neste trabalho
CLAE – UV/Fluorescência	danofloxacin	0,039	[25]
CLAE-deteção eletroquímica	danofloxacin	0,0016	[26]
Voltametria de Varredura Linear de Redissolução	ofloxacin	0,006	[27]
	ciprofloxacin	0,011	[27]
Fluorescência de Emissão e Excitação	danofloxacin	0,0124	[28]
VOQ adsortiva	norfloxacin	1,1	[10]



#### 4. CONCLUSÕES

Esse trabalho descreve a aplicação de uma técnica eletroanalítica para análise da danofloxacin em amostras de urina bovina e suína. Os melhores resultados analíticos com eletrodo de carbono vítreo foram obtidos em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, concentração de 4,0 μmol L<sup>-1</sup> do surfactante Lauril sulfato de sódio, com frequência da onda quadrada de 20 Hz, amplitude de 20 mV, incremento de potencial de 8 mV. A danofloxacin nessas condições apresentou 2 picos de oxidação, sendo estudado o mais intenso em 0,98 V vs. Ag/AgCl, com característica de processo irreversível.

O limite de detecção obtido com o eletrodo de carbono vítreo foi de 0,88 μg mL, para as amostras de urina apresentaram recuperação de 95,3% para urina bovina e 98,7 % para urina suína, resultado esse considerado satisfatório pelo fato dos interferentes presentes na urina, e que pelo simples tratamento da amostra pode-se determinar o antibiótico presente. O método desenvolvido apresentou resultados satisfatórios quando comparamos a técnica oficial de determinação desse fármaco, a espectrofotometria de UV/VIS.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do CNPq, CAPES, UFGD e FUNDECT.

#### 6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Silva, J. M. B.; Hollenbach, C. B. *Arquivo Instituto Biológico* **2010**, *77*, 363.
- [2] Appelbaum, P. C.; Hunter, P. A. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 5. [[CrossRef](#)]
- [3] Cruz, A. D.; Batista, G. C. M.; Modolo, J. R.; Gottschalk, A. F.; Lopes, C. A. M. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **1998**, *50*, 369.
- [4] Martinez, M.; McDermott, P.; Walker, R. *Vet. J.* **2006**, *172*, 10. [[CrossRef](#)].
- [5] Giles, C. J.; Magonigle, R. A.; Grimshaw, W. T.; Tanner, A. C.; Risk, J. E.; Lynch, M. J.; Rice, J. R. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1991**, *14*, 400. [[CrossRef](#)]
- [6] Haritova, A. M.; Lashev, L. D. *Bulg. J. Vet. Med.* **2009**, *12*, 3.
- [7] Bila, D. M.; Dezotti, M. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 523, 2003. [[CrossRef](#)]
- [8] Garcia, A. F.; Rollemberg, M. C. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1592. [[CrossRef](#)]
- [9] Trindade, M. A. G.; Silva, G. M.; Ferreira, V. S. *Microchem. J.* **2005**, *81*, 209. [[CrossRef](#)]
- [10] Ghoneim, M. M.; Radi, A.; Beltagi, A. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 205. [[CrossRef](#)]
- [11] Goyal, R. N.; Rana, A. R. S.; Chasta, H. *Bioelectrochemistry* **2012**, *83*, 46. [[CrossRef](#)]
- [12] Uslu, B.; Topal, B. D.; Ozkan, S. A. *Talanta* **2008**, *74*, 1191. [[CrossRef](#)]
- [13] Radi, A.; El-Sherif, Z. *Talanta* **2002**, *58*, 319. [[CrossRef](#)]
- [14] Al-Ghamdi, A. F. *J. Saudi Chem. Soc.* **2009**, *13*, 235. [[CrossRef](#)]
- [15] Ensaifi, A. A.; Khayamiant, T.; Taei, M. *Talanta* **2009**, *78*, 942. [[CrossRef](#)]
- [16] El-Shal, M. A. *J. Pharm. Res. (Gurgaon, India)* **2012**, *5*, 280. [[Link](#)]
- [17] Temerk, Y. M.; Kamal, M. M.; Ibrahim, M. S.; Alhagri, I. A. *Eurasian J. Anal. Chem.* **2009**, *4*, 53. [[Link](#)]
- [18] Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81. [[CrossRef](#)]
- [19] Pharmacopeial Convention, T. U. S. Fluoroquinolones (Veterinary-Systemic). In: The United States Pharmacopeial Convention. Anais... [S.l: s.n.], 2007.
- [20] Atta, N. F.; Galal, A.; Abu-Attia, F. M.; Azab, S. M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2510. [[CrossRef](#)]
- [21] Nezamzadeh-Ejhieh, A.; Badri, A. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *660*, 1. [[CrossRef](#)]
- [22] Lovric, M. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *248*, 239. [[CrossRef](#)]
- [23] Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835. [[CrossRef](#)]
- [24] Harris, D. C. Quantitative Chemical Analysis. 8th ed. New York: Clancy Marshall, 2010. p. 719
- [25] Galarini, R.; Fioroni, L.; Angelucci, F.; Tovo, G. R.; Cristofani, E. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 46, 8158. [[CrossRef](#)]
- [26] Cáceres, M. I. R. A. Cabanillas, G.; Díaz, T. G.; Cañas, M. A. M. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 398. [[CrossRef](#)]
- [27] Ni, Y.; Wang, Y.; Kokot, S. *Talanta* **2006**, *69*, 216. [[CrossRef](#)]
- [28] Cañada-Cañada, F.; Espinosa-Mansillaa, A.; de la Peñaa, A. M.; Giróna, A. J.; González-Gómez, D. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1260. [[CrossRef](#)]

## Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme

Milena M. Andrade<sup>a</sup>, Aneli M. Barbosa<sup>a,\*</sup>, Robert F. H. Dekker<sup>a</sup>, Maria I. Rezende<sup>b</sup>, Josana M. Messias<sup>b,#</sup> and Luiz H. Dall'antonia<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, CCE, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina – PR, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina – PR, Brazil

<sup>#</sup>Present address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP – Universidade de São Paulo, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto – SP, Brazil

Article history: Received: 23 March 2014; revised: 13 July 2014; accepted: 11 August 2014. Available online: 01 September 2014.

**Abstract:** The amino acids that form the chemical structure of several lipase catalytic triads (serine, histidine and glutamic or aspartic acid), as well as glycine, were added to soybean meal in distilled water as nutrient for *Botryosphaeria ribis* EC-01 to produce lipase under submerged fermentation. The addition of glutamic acid at 0.01% concentration increased lipase activity by 60% (2,684 U g<sup>-1</sup> of dry substrate), while at 0.1% the increase was 80% (3,039 U g<sup>-1</sup> of dry substrate) by comparison with the control (1,690 U g<sup>-1</sup> of dry substrate). Glycine also stimulated lipase production on this medium increasing the enzyme production by 31% (25 U mL<sup>-1</sup>) by comparison to the control (19 U mL<sup>-1</sup>). The optimal pH of this lipase was 8.0 in phosphate buffer, and was stable in the pH range (3–10), while the optimal temperature was 55 °C. The fungal lipase remained active in methanol, ethanol and glycerol at concentrations of 25, 10 and 50 % (v/v), respectively. The addition of the metal cations Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> increased lipase activity, while Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> partially inhibited the enzyme. Some kinetic properties were also determined that demonstrated that *B. ribis* EC-01 lipase was a true lipase preferring long chain fatty acyl esters as substrates. These properties make *B. ribis* EC-01 lipase attractive for use in the production of biodiesel.

**Keywords:** enzyme production; submerged fermentation; agro-industrial waste residues; kinetic properties

### 1. INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolases) belong to a group of enzymes of great technological interest and are produced by plants, mammals, and microorganisms that include bacteria, actinobacteria, yeasts and fungi. Fungal lipases are versatile enzymes because of their properties - stability, cofactors not required, and wide substrate specificity - that make them attractive from an industrial standpoint [1, 2].

Microbial lipases are produced mostly by submerged fermentation (SmF) in a complex nutrient medium influenced by the type and concentration of carbon (C) and nitrogen (N) sources, nutrients, pH and temperature [1, 3, 4]. Vegetable oils and animal fats appear to be the preferable C sources to induce

lipase production [5-7], however, some reports have demonstrated good lipase production in the absence of lipids as inducers [8, 9]. Inorganic and organic sources of N can also influence lipase production [10-13]. Nitrate and ammonium salts, peptone, soybean meal, urea, hydrolyzed proteins and amino acids are the most commonly used N sources for lipase production, although amino acids and proteins can also act as C sources by certain fungi [14].

Lipases have a broad spectrum of applications [1] but their use to convert vegetable oils to methyl, or other short chain alcohol esters, in a single transesterification reaction has been one of the most active fields of recent research. The increasing interest in using lipases as biocatalysts for biofuels production is related to the easy separation of the product, fatty acyl alkyl esters that constitute

\*Corresponding author. E-mail: [anelibarbosa@gmail.com](mailto:anelibarbosa@gmail.com)

biodiesel, their purification, minimal wastewater treatment, and facile recovery of glycerol in comparison to the chemical catalyzed processes of making biodiesel [15-17]. The cost of lipase still disfavors this application, but the enzyme production cost and its possible immobilization could be the key to an economical process for making biodiesel.

*Botryosphaeria ribis* EC-01, an ascomycete, was previously selected as a good producer of lipase when grown on different vegetable oils, including soybean oil [18]. This fungal isolate produced high levels of lipase in submerged cultivation when grown only on soybean meal in the presence of distilled water, proving that agro-industrial waste residues can be used as a nutrient source for producing lipases and thereby reducing the cost of production. The addition of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  enhanced lipase activity by this fungal isolate when cultivated on soybean meal in terms of specific activity [19].

In this work, the amino acids serine, histidine, glutamic and aspartic acid and glycine when added to soybean meal were evaluated in order to enhance lipase production by *B. ribis* EC-01 under SmF. These amino acids are not present in the composition of soybean meal, or when present, appear in small amounts. The influence of several metal salts, solvents and detergents on *B. ribis* EC-01 lipase activity, as well as the substrate specificities, together with the apparent  $K_m$  for substrates of 2 to 18 carbon chain lengths, were also evaluated. Considering that the main objective is the future immobilization of lipase and its application to produce biodiesel, this study was performed using the crude enzyme extract which is the norm in commercial processes employing enzymes.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### Materials

Soybean meal was kindly donated by Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Cambé-PR, Brasil). *p*-Nitrophenyl esters (acetate, butyrate, caproate, caprate, palmitate and stearate) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All the other reagents were of analytical grade.

### Cultivation of *Botryosphaeria ribis* EC-01

*Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) was maintained on

potato-dextrose agar (PDA) slants at  $4.0 \pm 2$  °C and sub-cultured at three-monthly intervals. *B. ribis* EC-01 was transferred to agar plates containing glucose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), Vogel minimum salts medium (VMSM) [20], agar ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), and left at  $28 \pm 2$  °C for 5 days. Following growth, four plugs of  $0.7 \text{ cm}^{-1}$  diameter were taken from the mat of mycelial-colonized agar plates. Inoculum were prepared in 125 mL erlenmeyer flasks, containing 1% (w/v) soybean meal in 25 mL distilled water, and incubated at 28 °C (180 rpm) for 120 h. Five-day old cultures of *B. ribis* EC-01 were harvested by centrifugation ( $1500 \times g/15 \text{ min}$ ), and the supernatants recovered (CLE) were used as the source of crude lipase to determine some enzyme properties. All experiments were carried out in replicates of three, and results are expressed as the means  $\pm$  SD.

### Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01: effect of amino acids added to soybean meal

The effect of soybean meal supplemented separately with different amino acids (serine, glycine, histidine, glutamic acid, aspartic acid) were examined as substrates for lipase production by *B. ribis* EC-01 in SmF, using 1% (w/v) soybean meal and concentrations ranging from 0.01 to 0.5% (w/v) of these amino acids.

### Analytical methods

Proteins were determined according to Bradford [21], using bovine albumin as the standard.

### Assay of lipase activity

All assays for lipase activity were determined using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as the standard substrate. The reaction was carried out in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 55 °C for 2 min. Absorbance was measured at 410 nm using the coefficient of molar extinction for *p*-nitrophenol (*p*-NP) of  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [18]. One unit (1 U) of lipase activity is defined as the release of 1  $\mu\text{mol}$  of *p*-NP per min per mL of enzyme solution.

Lipase activity was tested against various synthetic substrates consisting of fatty-acyl esters of *p*-nitrophenyl such as acetate (C2), butyrate (C4), caproate (C6), caprate (C10), palmitate (C16) and stearate (C18). The reactions were performed at 55 °C (pH 8.0) for 2 min.

### Effect of pH and temperature on lipase activity

*B. ribis* EC-01 lipase was assayed using *p*-NPP as substrate by incubating the crude lipase extract (CLE) in 0.05 M of the different buffer systems at pH ranging from 3–10, and at temperatures ranging from 30 to 65 °C (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) for 2 min at 55 °C. The different buffers used were citrate–phosphate (pH 3–7), phosphate (pH 6–8), Tris–HCl (pH 8–9), boric acid–borax (pH 8–9) and glycine–NaOH (pH 9–10).

### Lipase temperature and pH stability

CLE was incubated at 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 and 80 °C for times ranging from 5 min to 3 h. For temperatures between 30 and 55 °C, the period of incubation was 96 h. At the pre-established time intervals, aliquots were removed and assayed for lipase activity under standard assay conditions. The influence of pH on enzyme stability was evaluated by incubating CLE (in the proportion of 1:1 in different buffer solutions with pH ranging from 3 to 10 as well as in distilled water) for 1 h at 30 °C followed by assay of lipase activity under standard assay conditions.

### Influence of metal salts, detergents and organic solvents on lipase activity

CLE was incubated with different metal salt solutions (1:1 ratio) at concentrations of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mM at 30 °C in water for 1 h. Similarly, CLE was incubated at 30 °C for 1 h in the presence of the surfactants: Tween 80, SDS (sodium dodecylsulfate) and Triton X–100, at a final concentration of 0.01 % (w/v). Relative lipase activity was measured under standard assay conditions.

Stability of lipase in organic solvents was evaluated by the protocol described by Sztajer et al. [22], but in this case, the CLE was incubated at 30 °C. Several organic solvents were tested. They included: glycerol (50%, v/v); ethanol and methanol (each at 1, 2, 5, 10, 25, 50 and 99.3 %, v/v) as stability in these solvents is desirable for transesterification in biodiesel production from plant seed-oils. Residual lipase activity was assayed against *p*-NPP as described above.

### Kinetic parameters

The apparent Michaelis–Menten constant ( $K_m$ )

and maximum velocity ( $V_{max}$ ) of the crude enzyme were calculated by Michaelis–Menten method using GraphPad Prism v.5.03 for Windows, GraphPad Software, Inc. (www.graphpad.com). Enzyme assay was carried out at optimal conditions at concentrations of esters of *p*-nitrophenols that ranged from 0.1 to 12 mM and at constant enzyme concentration (100  $\mu$ L).

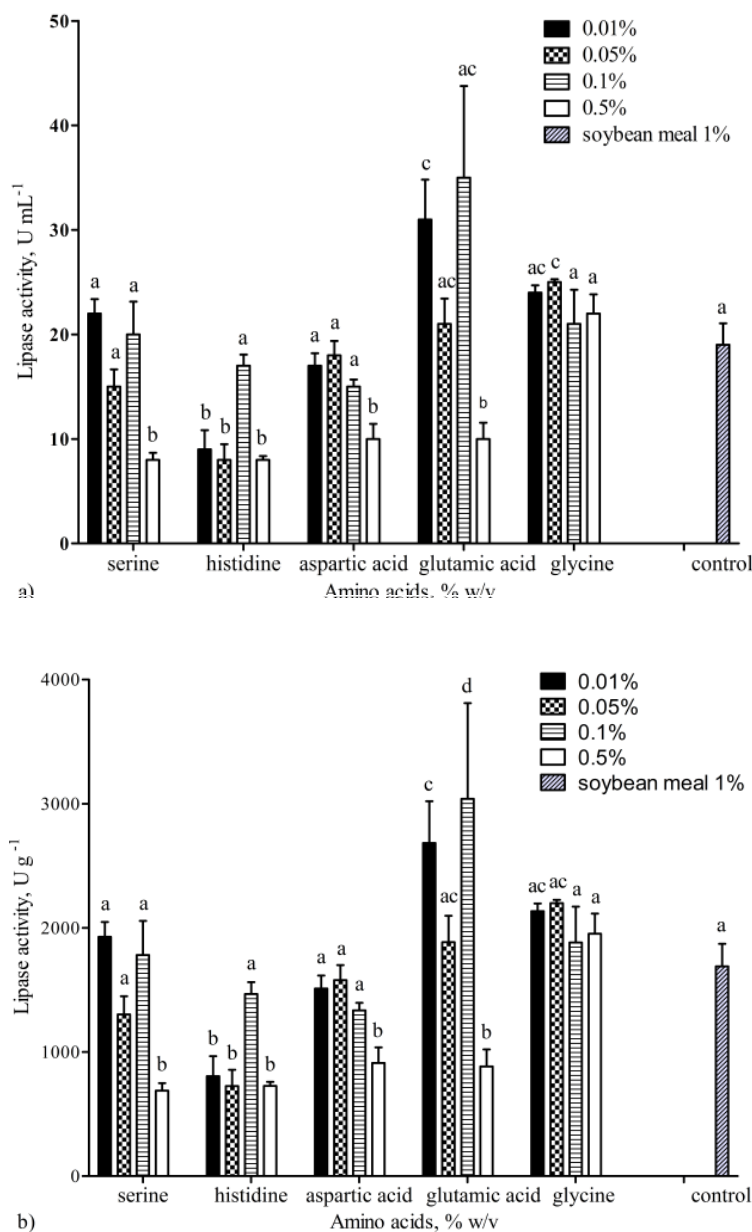
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### Influence of amino acids on lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 in distilled water with soybean meal as substrate

Soybean meal is a rich source of proteins and amino acids, especially arginine, leucine and lysine [23], and few studies [10, 24, 25] have described the use of this agro-industrial waste residue as fermentative substrates for lipase production by SmF. Most studies have used rich nutrient media with addition of vegetable oils (soybean, olive), sources of sulfates and phosphates, peptone, glucose, yeast extract and corn steep liquor. Although soybean is rich in some amino acids, it does not have all those present that are found in the catalytic triad of lipases, particularly serine, histidine, glutamic or aspartic acid [23]. Our aim was therefore to evaluate the addition of each of the above amino acids in the concentration range (0.01 to 0.5% w/v), using only distilled water and soybean meal (1%, w/v), in order to evaluate the effect of the respective amino acids on lipase production. Glycine was also included in this study considering that this amino acid is part of the lipase composition, although it does not belong to the catalytic triad. Lipase production was determined in  $U\ mL^{-1}$ , and  $U\ g^{-1}$  of dry substrate (Figure 1a and 1b). The comparison of all amino acids evaluated at 0.01 % (w/v) concentration, revealed that glutamic acid stimulated lipase production by 60% ( $31 \pm 3.8\ U\ mL^{-1}$ ) in relation to the control ( $19 \pm 2.0\ U\ mL^{-1}$ ). Glycine (0.05%, w/v) increased enzyme production by 31 % ( $25 \pm 0.3\ U\ mL^{-1}$ ). At both concentrations all the other amino acids showed no significant difference when compared to the control. Kathiravan et al. [26] evaluated the effect of various amino acids on lipase production by the bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, by SmF and observed that glutamic acid and glycine at 0.2% concentration in a minimal medium, without soybean meal, increased lipase production by 240 and 200%, respectively. Makhzoum et al. [27] tested amino acids at 5 mM as sole nitrogen source in minimal medium for *P.*

*fluorescens* 2D, and glutamic acid and glycine were the amino acids that showed a moderate stimulatory

effect on lipase production.



**Figure 1.** Effect of different amino acids on lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 in (a) U mL<sup>-1</sup>; and (b) U g<sup>-1</sup> of dry substrate. Same letters on columns in each graph indicates that the means difference are not significant at the  $p$  0.05 level by the Tukey test.

Glutamic acid at concentrations of 0.01 and 0.1% was the only amino acid that showed a significant increased difference ( $p < 0.05$ ) on lipase production by *B. ribis* EC-01 in U g<sup>-1</sup> of dry substrate (Figure 1b) in relation to the control (1,690 ± 181 U g<sup>-1</sup> of dry substrate). Glutamic acid at 0.01% concentration promoted a 60% increase in lipase activity (2,684 ± 336 U g<sup>-1</sup> of dry substrate), while at

0.1% the increase was 80% (3,039 ± 771 U g<sup>-1</sup> of dry substrate) compared to the control.

#### Physicochemical parameters of *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase

*Botryosphaeria ribis* EC-01 was grown on 1% (w/v) soybean cake with only distilled water, and the

supernatant used as the source of lipases to determine the properties listed below.

### Effects of pH and temperature

Lipases have promising commercial applications: in detergent formulations, production of oleochemicals, dairy and food products, pitch removal from paper, use in cosmetics and pharmaceuticals [1]. Every application requires unique properties in specificity, stability, temperature and pH of the lipase preparation.

The *B. ribis* EC-01 lipase was shown to be active in the range of the pH evaluated (3-10), and highest activity was detected at pH 8 in phosphate buffer (data not shown), which is in accordance to other fungal lipases [28, 29] that have generally been described to vary the between 6 to 9 [30, 31].

Table 1 presents the results on lipase stability of *B. ribis* EC-01 in the range of pH (3-10) after 1 h

incubation at 30 °C. The enzyme was stable at all of the pH values evaluated, and retained from 61 to 93% of its original enzyme activity.

Fungal lipases exhibit optimum temperature usually between 25–30 °C [32], except for thermophilic fungi that exhibit higher optima; 45–70 °C [32, 33]. *B. ribis* EC-01 lipase demonstrated optimum temperature at 55 °C as has been observed for some bacterial [34, 35] and other fungal lipases [36]. Thermal stability (at least 65%) was observed with *B. ribis* EC-01 lipase at temperatures ranging from 30 to 55 °C after 96 h incubation. At 48 h, the activity remained 74–90% at these temperatures. At 60 °C, *B. ribis* EC-01 lipase retained 65% of its initial activity after 30 min of incubation. During 10 min, this lipase was stable at 70 °C (data not shown). Similar results were reported for the lipase of *Aspergillus carneus*, which was stable for 5 min at this temperature [37].

**Table 1.** *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase stability in different buffers.

Buffers (0.05 M)	pH	Relative residual activity (%) <sup>a</sup>
Control	-	100 ± 1.35
citrate-phosphate	3	72.4 ± 2.69
citrate-phosphate	4	66.7 ± 1.35
citrate-phosphate	5	75.2 ± 0.67
citrate-phosphate	6	63.2 ± 3.20
citrate-phosphate	7	61.4 ± 3.70
sodium phosphate	6	88.0 ± 0.84
sodium phosphate	7	65.7 ± 0.67
sodium phosphate	8	79.2 ± 2.19
boric acid-borax	8	62.6 ± 4.38
boric acid-borax	9	79.2 ± 1.85
Tris-HCl	8	93.0 ± 1.85
Tris-HCl	9	73.0 ± 2.53
glycine-NaOH	9	76.8 ± 3.20
glycine-NaOH	10	88.8 ± 5.39

<sup>a</sup> 1 h at 30 °C. *p*-NPP was used as substrate for lipase activity determination

### Effect of surfactants, metal cations and organic solvents

The surfactants tested did not exert a negative effect on *B. ribis* EC-01 lipase activity. Tween 80 and SDS increased lipase activity by 23% (34.7 ± 1.41;

34.9 ± 0.89 U mL<sup>-1</sup>, respectively) compared to the control (28.3 ± 0.38 U mL<sup>-1</sup>). Triton X-100 did not affect lipase activity (28.9 ± 0.75 U mL<sup>-1</sup>). Similar results for Triton X-100 and Tween 80 were reported by Liu et al. [31]. In contrast, Triton X-100, Tween-

80 and SDS reduced *Galactomyces geotrichum* Y05 lipase activity by 33, 5 and 5%, respectively [38].

The effects of some metal salts on the activity of *B. ribis* EC-01 lipase are listed in Table 2. The cations  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  were the most significant activators ( $p < 0.05$ ), with a difference to the control of 14.10 to 33.54% increasing lipase activity in almost all of the concentrations evaluated.

The lipase activity of *Rhizopus homothallicus* [39] and *Penicillium* sp. DS-39 [30] also increased in the presence of  $Mn^{2+}$ , while lipase activity decreased for a lipase from *Rhizopus delemar* [40].  $Mg^{2+}$  ion increased the activities of lipases for *Aspergillus carneus* [37] and *Mucor hiemalis f. hiemalis* [41].  $Ba^{2+}$  had no significant effect on *Galactomyces geotrichum* Y05 lipase [38], while *Fusarium solani* N4-2 lipase was inhibited [31].

**Table 2.** Influence of metal cations on lipase activity from *Botryosphaeria ribis* EC-01<sup>1</sup>.

Metal cations	Relative lipase activity (%) <sup>2</sup>					
	1 mM	5 mM	10 mM	25 mM	50 mM	100 mM
Control	100 ± 3.0 <sup>a</sup>					
$Mn^{2+}$ ( $MnCl_2$ )	123 ± 3.0 <sup>bA</sup>	124 ± 0.6 <sup>bA</sup>	120 ± 3.9 <sup>bA</sup>	117 ± 4.2 <sup>bA</sup>	101 ± 1.8 <sup>aB</sup>	99.6 ± 0.6 <sup>aB</sup>
$Mg^{2+}$ ( $MgCl_2$ )	117 ± 3.4 <sup>bA</sup>	114 ± 0.9 <sup>bA</sup>	111 ± 5.4 <sup>aA</sup>	116 ± 3.6 <sup>bA</sup>	107 ± 0.9 <sup>aA</sup>	105 ± 1.8 <sup>aA</sup>
$Ca^{2+}$ ( $CaCl_2$ )	107 ± 3.3 <sup>aA</sup>	112 ± 4.2 <sup>aA</sup>	101 ± 3.3 <sup>aA</sup>	103 ± 4.2 <sup>aA</sup>	94.9 ± 0.6 <sup>aAB</sup>	83.1 ± 6.3 <sup>bB</sup>
$K^+$ ( $KCl$ )	99.8 ± 1.5 <sup>aAB</sup>	106 ± 3.3 <sup>aA</sup>	107 ± 3.9 <sup>aA</sup>	105 ± 3.9 <sup>aAB</sup>	106 ± 4.8 <sup>aAB</sup>	92.5 ± 0.9 <sup>aB</sup>
$Zn^{2+}$ ( $ZnCl_2$ )	99.4 ± 0.9 <sup>aA</sup>	102 ± 3.3 <sup>aA</sup>	98.3 ± 4.2 <sup>aA</sup>	93.6 ± 1.2 <sup>aA</sup>	96.4 ± 5.1 <sup>aA</sup>	92.5 ± 2.7 <sup>aA</sup>
$Na^+$ ( $NaCl$ )	114 ± 1.51 <sup>A</sup>	103 ± 4.5 <sup>aAB</sup>	102 ± 3.6 <sup>aAB</sup>	104 ± 3.9 <sup>aAB</sup>	98.1 ± 4.5 <sup>aB</sup>	98.1 ± 3.9 <sup>aB</sup>
$Ba^{2+}$ ( $BaCl_2$ )	95.5 ± 4.5 <sup>aB</sup>	124 ± 2.1 <sup>bA</sup>	134 ± 2.1 <sup>bA</sup>	114 ± 1.2 <sup>bAC</sup>	110 ± 4.8 <sup>aC</sup>	97.6 ± 0.3 <sup>aB</sup>
$Ag^+$ ( $AgNO_3$ )	97.6 ± 1.5 <sup>aA</sup>	97.4 ± 4.8 <sup>aA</sup>	96.6 ± 3.9 <sup>aA</sup>	101 ± 4.2 <sup>aA</sup>	95.3 ± 3.0 <sup>aA</sup>	98.1 ± 0.9 <sup>aA</sup>
$Co^{2+}$ ( $CoCl_2$ )	98.3 ± 3.0 <sup>aAC</sup>	98.5 ± 3.3 <sup>aAC</sup>	105 ± 3.9 <sup>aA</sup>	91.5 ± 2.4 <sup>aC</sup>	62.4 ± 0.6 <sup>bB</sup>	52.4 ± 2.7 <sup>bB</sup>
$Cu^{2+}$ ( $CuSO_4$ )	95.5 ± 2.7 <sup>aA</sup>	81.6 ± 3.6 <sup>bB</sup>	75.4 ± 0.9 <sup>bB</sup>	40.2 ± 4.8 <sup>bC</sup>	36.8 ± 3.3 <sup>bC</sup>	33.5 ± 0.3 <sup>bC</sup>
$Hg^{2+}$ ( $HgCl_2$ )	93.2 ± 3.6 <sup>aA</sup>	86.3 ± 0.0 <sup>bAB</sup>	72.9 ± 4.5 <sup>bBC</sup>	69.4 ± 3.9 <sup>bC</sup>	65.2 ± 3.9 <sup>bC</sup>	65.2 ± 5.7 <sup>bC</sup>
$Fe^{3+}$ ( $FeCl_3$ )	96.4 ± 3.3 <sup>aA</sup>	72.6 ± 3.6 <sup>bB</sup>	71.6 ± 5.1 <sup>bB</sup>	81.4 ± 0.3 <sup>bAB</sup>	79.1 ± 3.6 <sup>bB</sup>	57.7 ± 5.4 <sup>bBC</sup>

<sup>1</sup>Values with different lowercase letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with the control by the Tukey test. Values with different uppercase letters in the row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between cation concentrations by the Tukey test.

<sup>2</sup>1 h at 30 °C. *p*-NPP was used to assay lipase activity

$Ca^{2+}$  did not affect *B. ribis* EC-01 lipase (1–50 mM), and at 100 mM lipase activity decreased by 16.88% ( $p < 0.05$ ). Dheeman et al. [30] found that  $Ca^{2+}$  at 1 and 10 mM increased *Penicillium* sp. DS-39 lipase activity.  $Na^+$  at 1 mM increased significantly the activity of *B. ribis* EC-01 lipase (13.88% ( $p < 0.05$ )) compared to the control, but showed no activity increases at the other concentrations examined.  $Na^+$  also was reported to have minimal effect on *Fusarium solani* N4-2 lipase [31], but enhanced *Rhizopus delemar* lipase activity [40]. Other cations  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Ag^+$  did not affect significantly ( $p < 0.05$ ) *B. ribis* EC-01 lipase.  $K^+$  and  $Na^+$  had little influence on *Galactomyces geotrichum* Y05 lipase activity, but  $Zn^{2+}$  partially inhibited and  $Ag^+$  totally inhibited at 1 mM [38]. *B. ribis* EC-01 lipase was partially inhibited ( $p < 0.05$ ) by  $Co^{2+}$  only at

concentrations over 50 mM (37.61 to 47.65 % of significant difference to control).  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  inhibited at concentrations greater than 5 mM (13.68 to 66.45% inhibition).  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  also inhibited the activity of *Rhizopus oryzae* lipase at 5 mM [42].  $Hg^{2+}$  partially inhibited lipase activity from *Penicillium* sp. DS-39 [30], and *Galactomyces geotrichum* Y05 totally [38] at 1 mM concentration. Abbas et al. [43] found that  $Co^{2+}$  at 1 mM enhanced the activity of *Mucor* sp. Lipase, and  $Fe^{3+}$  totally inhibited at the same concentration.

The activity of *B. ribis* EC-01 lipase was evaluated in the presence of water-miscible solvents such as acetone, butanol, isopropanol, methanol and ethanol at concentration up to 99.3% (v/v), and was incubated for 1 h at 30 °C (Table 3).

**Table 3.** Influence of different solvents on the activity of the crude lipase preparation from *Botryosphaeria ribis* EC-01.

Solvent (% v/v)	Relative residual activity (%) <sup>a</sup>
Control	100 ± 5.26
Propanone (99.3)	31.1 ± 1.23
<i>n</i> - Butanol (99.3)	45.9 ± 0.35
Isopropyl alcohol (99.3)	68.0 ± 7.02
Hexane <sup>b</sup> (99.3)	25.5 ± 2.31
Toluene <sup>c</sup> (99.3)	1.1 ± 0.00
Glycerol (50.0)	104 ± 8.95
Methanol	
(1.00)	110 ± 1.58
(2.00)	110 ± 0.35
(5.00)	104 ± 6.84
(10.0)	95.0 ± 2.11
(25.0)	96.0 ± 0.70
(50.0)	61.5 ± 7.02
(99.3)	18.7 ± 0.88
Ethanol	
(1.00)	107 ± 1.05
(2.00)	102 ± 0.00
(5.00)	86.7 ± 5.44
(10.0)	82.3 ± 4.04
(25.0)	32.4 ± 0.18
(50.0)	47.6 ± 2.81
(99.3)	37.2 ± 2.46

<sup>a</sup> 1 h at 30 °C. *p*-NPP was used to assay lipase activity.

<sup>b</sup> Complete solvent evaporation at room temperature for 4.5 h.

<sup>c</sup> Complete solvent evaporation at room temperature for 30 h.

The relative residual activity of the lipase ranged from 18.7 to 68% (v/v), and the enzyme remained stable in the presence of 25% (v/v) methanol and 10% (v/v) ethanol, retaining more than 82% of its initial activity. The lipase from *Rhizopus oryzae* in presence of 30% (v/v) of methanol and ethanol exhibited, respectively, 2 and 33% of its initial activity (1 h at 25 °C) [42]. Saxena et al. [37] reported that *Aspergillus carneus* lipase retained of 59.16 and 55.27 % of its original activity in 40% methanol and ethanol, respectively, after 30 min incubation. *B. ribis* EC-01 lipase similarly retained 61.5% and 47.6% activity in methanol and ethanol at 50% concentration, respectively, after 1 h incubation. This lipase was also stable in the presence of 50% (v/v) glycerol, retaining its total activity. These results demonstrate the applicability of *B. ribis* EC-01 lipase

in biodiesel production. *B. ribis* EC-01 lipase exhibited low stability in 99.3% (v/v) immiscible solvents, while about 25.5% of its initial activity was retained in hexane and 1.1% in toluene.

#### Substrate specificity - apparent $K_m$ and $V_{max}$

*B. ribis* EC-01 lipase hydrolyzed all tested substrates at different degrees (see Table 4). Lipase activity was lower for *p*-nitrophenyl acetate ( $0.08 \pm 0.04$  U mL<sup>-1</sup>) and increased as the fatty acid chain length increased, such as *p*-nitrophenyl palmitate ( $35.53 \pm 0.57$  U mL<sup>-1</sup>). The relative lipase activities (%) on the substrates C2, C4, C6, C10, C16 and C18 were  $0.22 \pm 0.10$ ,  $13.6 \pm 0.99$ ,  $0.46 \pm 0.09$ ,  $12.57 \pm 1.31$ ,  $100.0 \pm 1.59$  and  $68.29 \pm 1.72$ , respectively. Similar results were observed with lipases produced



by *Streptomyces* sp., CS326 [44], and *Pseudomonas aeruginosa* PseA [45], both of which preferred longer carbon chain fatty acid substrates, such as *p*-nitrophenyl palmitate. Table 4 also presents the  $K_m$  (apparent) and  $V_{max}$  of crude *B. ribis* EC-01 lipase. Low values of  $K_m$  represent a high affinity for a specific substrate. The  $K_m$  values for enzymes vary

widely, but for most industrial enzymes used, they range from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  M [1]. Considering that the lipase from *B. ribis* EC-01 was produced on a solid substrate by SmF, the future goal will be to immobilize this enzyme and apply the immobilized lipase in transesterification for biodiesel production.

**Table 4.** Substrate specificity,  $K_m$  (apparent) and  $V_{max}$  of the crude lipase produced by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean meal.

Substrates <sup>a</sup>	Lipase activity (U mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$K_{m(\text{app})}$ (mM) <sup>c</sup>	$V_{\text{max}(\text{app})}$ <sup>c</sup> ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)
<i>p</i> -nitrophenyl acetate (2:0) <sup>d</sup>	0.08 ± 0.04	3.20 ± 0.78	15.4 ± 1.34
<i>p</i> -nitrophenyl butyrate (4:0)	4.48 ± 0.35	0.972 ± 0.11	23.2 ± 0.59
<i>p</i> -nitrophenyl caproate (6:0)	0.18 ± 0.02	0.943 ± 0.35	0.640 ± 0.05
<i>p</i> -nitrophenyl caprate (10:0)	4.47 ± 0.47	0.819 ± 0.22	30.9 ± 1.90
<i>p</i> -nitrophenyl palmitate 16:0)	35.5 ± 0.57	0.372 ± 0.08	107 ± 4.09
<i>p</i> -nitrophenyl stearate (18:0)	24.3 ± 0.61	0.512 ± 0.18	97.9 ± 6.88

<sup>a</sup> *p*-nitrophenyl esters were used as substrates.

<sup>b</sup> *p*-nitrophenyl esters used as substrates at 8 mM.

<sup>c</sup> *p*-nitrophenyl esters varied from 0.1 to 12 mM.

<sup>d</sup> Carbon chain length in parentheses.

The affinity of *B. ribis* EC-01 lipase was evaluated on *p*-nitrophenyl esters of varying chain length (Table 4), and showed that this lipase exhibited a high affinity for *p*-NPP with a  $K_{m(\text{app})}$  of  $0.372 \pm 0.08$  mM and a  $V_{\text{max}(\text{app})}$  of  $107 \pm 4.09$   $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , and is considered a true lipase [46]. For the same substrate, *Streptomyces* sp. CS326 [44] and *Pseudomonas aeruginosa* PseA [45] lipases exhibited  $K_m$  and  $V_m$ , respectively, of 0.24 mM and 4.6 mM  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and 71.4 mM and 2.24  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . A *Fusarium solani* lipase showed a  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  of 1.8 mM and 1.7  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively for *p*-NPP [47].

#### 4. CONCLUSION

This work demonstrated that adding 0.01% (w/v) glutamic acid to distilled water containing soybean meal (1%, w/v) effectively increased lipase production by 60 and 80% in terms of U mL<sup>-1</sup> and U g<sup>-1</sup> of dry substrate, respectively. Glycine also stimulated lipase production on this simple nutrient medium increasing enzyme production by 30% in comparison to the control in U mL<sup>-1</sup>. The lipase produced showed good thermal stability, as well as stability in the presence of detergents, salts and

solvents, and displayed high affinity for long-chain fatty acyl esters. These properties make *B. ribis* EC-01 lipase attractive for use in biodiesel production.

#### 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Fundação Araucária do Paraná for financial support. M. M. Andrade is grateful to CAPES-Brazil for the award of a scholarship.

#### 6. REFERENCE AND NOTES

- [1] Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627. [[CrossRef](#)]
- [2] Singh, A. K.; Mukhopadhyay, M. *Appl. Biochem. Biotech.* **2012**, *166*, 486. [[CrossRef](#)]
- [3] Andualema, B.; Gessesse, A. *Biotechnology* **2012**, *11*, 100. [[CrossRef](#)]
- [4] Ghosh, P. K.; Saxena, R. K.; Gupta, R.; R., G.; Yadav, R. P.; Davidson, S. *Sci Prog.* **1996**, *79*, 119. [[CrossRef](#)]
- [5] Dalmau, E.; Montesinos, J. L.; Lotti, M.; Casas, C. *Enz. Microb. Technol.* **2000**, *26*, 657. [[CrossRef](#)]
- [6] Pogori, N.; Cheikhoussef, A.; Xu, Y.; Wang, D. *Biotechnology* **2008**, *7*, 710. [[CrossRef](#)]
- [7] Liu, C.-H.; Huang, C.-C.; Wang, Y.-W.; Chang, J.-S. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2012**, *43*, 511. [[CrossRef](#)]

- [8] Lin, E.-S.; Ko, H.-C. *Enz. Microb. Technol.* **2005**, *37*, 261. [[CrossRef](#)]
- [9] Sekhon, A.; Dahyia, N.; Tewari, R. P.; Hoondal, G. S. *Indian J. Biotech.* **2006**, *5*, 179.
- [10] Tan, T.; Zhang, M.; Wang, B.; Ying, C.; Deng, L. *Process Biochem.* **2003**, *39*, 459. [[CrossRef](#)]
- [11] Fickers, P.; Nicaud, J. M.; Gaillardin, C.; Destain, J.; Thonart, P. *J. Appl. Microb.* **2004**, *96*, 742. [[CrossRef](#)]
- [12] He, Y.-Q.; Tan, T.-W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *43*, 9. [[CrossRef](#)]
- [13] Teng, Y.; Xu, Y. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3900. [[CrossRef](#)]
- [14] Carlile, M. J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. *The fungi*, 2nd ed. London: Academic Press, 2001.
- [15] Bajaj, A.; Lohan, P.; Jha, P. N.; Mehrotra, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 9. [[CrossRef](#)]
- [16] Ghaly, A. E.; Dave, D.; Brooks, M. S.; Budge, S. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *6*, 54. [[CrossRef](#)]
- [17] Vyas, A. P.; Verma, J. L.; Subrahmanyam, N. *Fuel* **2010**, *89*, 1. [[CrossRef](#)]
- [18] Messias, J. M.; da Costa, B. Z.; de Lima, V. M. G.; Dekker, R. F. H.; Rezende, M. I.; Krieger, N.; Barbosa, A. M. *Enz. Microb. Tech.* **2009**, *45*, 426. [[CrossRef](#)]
- [19] Barbosa, A. M.; Messias, J. M.; Andrade, M. M.; Dekker, R. F. H.; Venkatesagowda, B. In *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*. Ng, T.-B., ed. InTech Publishers, 2011, chapter 7.
- [20] Vogel, H. J. *Microbial Genetics Bulletin* **1956** *13*, 42.
- [21] Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248. [[CrossRef](#)]
- [22] Sztajer, H.; Lünsdorf, H.; Erdmann, H.; Menge, U.; Schmid, R. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1992**, *1124*, 253. [[CrossRef](#)]
- [23] Ramachandran, S.; Singh, S. K.; Larroche, C.; Socol, C. R.; Pandey, A. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 2000. [[CrossRef](#)]
- [24] Lotrakul, P.; Dharmsthiti, S. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *13*, 163. [[CrossRef](#)]
- [25] Tan, T.; Zhang, M.; Xu, J.; Zhang, J. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1495. [[CrossRef](#)]
- [26] Kathiravan, T.; Marykala, J.; Sundaramanickam, A.; Kumaresan, S.; Balasubramanian, T. *Adv. App. Sci. Res.* **2012**, *3*, 591.
- [27] Makhzoum, A.; Knapp, J. S.; Owusu, R. K. *Food Microbiol.* **1995**, *12*, 277. [[CrossRef](#)]
- [28] Lima, V. M. G.; Krieger, N.; Mitchell, D. A.; Fontana, J. D. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *18*, 65. [[CrossRef](#)]
- [29] Shu, C.-H.; Xu, C.-J.; Lin, G.-C. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 734. [[CrossRef](#)]
- [30] Dheeman, D. S.; Antony-Babu, S.; Frías, J. M.; Henehan, G. T. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *72*, 256. [[CrossRef](#)]
- [31] Liu, R.; Jiang, X.; Mou, H.; Guan, H.; Hwang, H.; Li, X. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 265. [[CrossRef](#)]
- [32] Sharma, D.; Sharma, B.; Shukla, A. K. *Biotechnology* **2011**, *10*, 23. [[CrossRef](#)]
- [33] Zheng, Y.-Y.; Guo, X.-H.; Song, N.-N.; Li, D.-C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *69*, 127. [[CrossRef](#)]
- [34] Sulong, M. R.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B.; Basri, M. *Protein Expression Purif.* **2006**, *49*, 190. [[CrossRef](#)]
- [35] Chartrain, M.; Katz, L.; Marcin, C.; Thien, M.; Smith, S.; Fisher, E.; Goklen, K.; Salmon, P.; Brix, T.; Price, K.; Greasham, R. *Enz. Microb. Technol.* **1993**, *15*, 575. [[CrossRef](#)]
- [36] Saad, M. M.; Kansoh, A. L.; Gadallah, M. A. *Arab J. Biotechnol.* **2005**, *8*, 19.
- [37] Saxena, R. K.; Davidson, W. S.; Sheoran, A.; Giri, B. *Process Biochem.* **2003**, *39*, 239. [[CrossRef](#)]
- [38] Yan, J.; Yang, J.; Xu, L.; Yan, Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *49*, 28. [[CrossRef](#)]
- [39] Mateos Diaz, J. C.; Rodríguez, J. A.; Roussos, S.; Cordova, J.; Abousalham, A.; Carriere, F.; Baratti, J. *Enz. Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1042. [[CrossRef](#)]
- [40] Açikel, Ü.; Erşan, M.; Sag Açikel, Y. *Turk J. Biol.* **2011**, *35*, 35.
- [41] Hiol, A.; Jonzo, M. D.; Druet, D.; Comeau, L. *Enz. Microb. Technol.* **1999**, *25*, 80. [[CrossRef](#)]
- [42] Hiol, A.; Jonzo, M. D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L. C. *Enz. Microb. Technol.* **2000**, *26*, 421. [[CrossRef](#)]
- [43] Abbas, H.; Hiol, A.; Deyris, V.; Comeau, L. *Enz. Microb. Technol.* **2002**, *31*, 968. [[CrossRef](#)]
- [44] Cho, S. S.; Park Da, J.; Simkhada, J. R.; Hong, J. H.; Sohng, J. K.; Lee, O. H.; Yoo, J. C. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 227. [[CrossRef](#)]
- [45] Gaur, R.; Gupta, A.; Khare, S. K. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1040. [[CrossRef](#)]
- [46] Jaeger, K.-E.; Eggert, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390. [[CrossRef](#)]
- [47] Maia, M. M. D.; Heasley, A.; Camargo de Morais, M. M.; Melo, E. H. M.; Morais Jr, M. A.; Ledingham, W. M.; Lima Filho, J. L. *Bioresour. Technol.* **2001**, *76*, 23.

## Synthesis, Modification and Antimicrobial Activity of Carbon Nanotube Matrix

E. Sudha<sup>a\*</sup>, R. Selvam<sup>b</sup>, P. Sivaswaroop<sup>c</sup>, and K. P. Subhash Chandran<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>JNTU Hyderabad, India.

<sup>b</sup>Research & P. G. Department of chemistry, SriVyasaNSS College, Thrissur, Kerala, India-680623.

<sup>c</sup>IGNOU Regional Center, Nagpur, India-440033.

Article history: Received: 21 April 2014; revised: 06 June 2014; accepted: 18 June 2014. Available online: 03 October 2014.

**Abstract:** A porous material fabricated from carbon nanostructure, multiwalled carbon nanotubes (MWNT) is synthesized, modified and structural characterization was done using SEM, Fe-SEM, TEM-EDXA, Raman spectra, and FTIR. Absorption capacity, thermal and chemical resistance were measured and antimicrobial activity was observed by filtering a bacterial suspension which contains *E.coli* through the membrane made of three-dimensional carbon nanotube matrices. The unique properties of this matrix make them an excellent candidate for filtering material and solid support for organic reactions.

**Keywords:** carbon nanotubes matrix; chemical functionalization; antimicrobial activity

### 1. INTRODUCTION

Carbon nanotubes introduced by Iijma [1] are tubular structures with nanoscale diameter and micrometer length. CNT-based materials have been synthesized in various forms and potentially used in variety of areas such as catalysis [2], super-capacitors [3], and in mechanical applications [4].

Three-dimensional networks of multi-walled carbon nanotubes (MWNT) synthesized consist of a porous hydrophobic matrix with a good sorption capacity. This is a light-weight matrix with good structural flexibility and chemical stability.

Macroscopic porous matrix [5] synthesized by modified chemical vapor deposition (CVD) method and the morphology of the material was studied using SEM, Fe-SEM, TEM-EDXA and FT-IR. Matrix synthesized consists of nano-sized pores as is evident from porosity measurements. Membranes made of these matrices can be effectively used as filtering oil, bacterial contaminants, nano-size viruses, and other pollutants from water. Modification of CNT matrix can be done by nitric acid treatment [6] followed by linker attachments [7].

### 2. MATERIALS AND METHODS

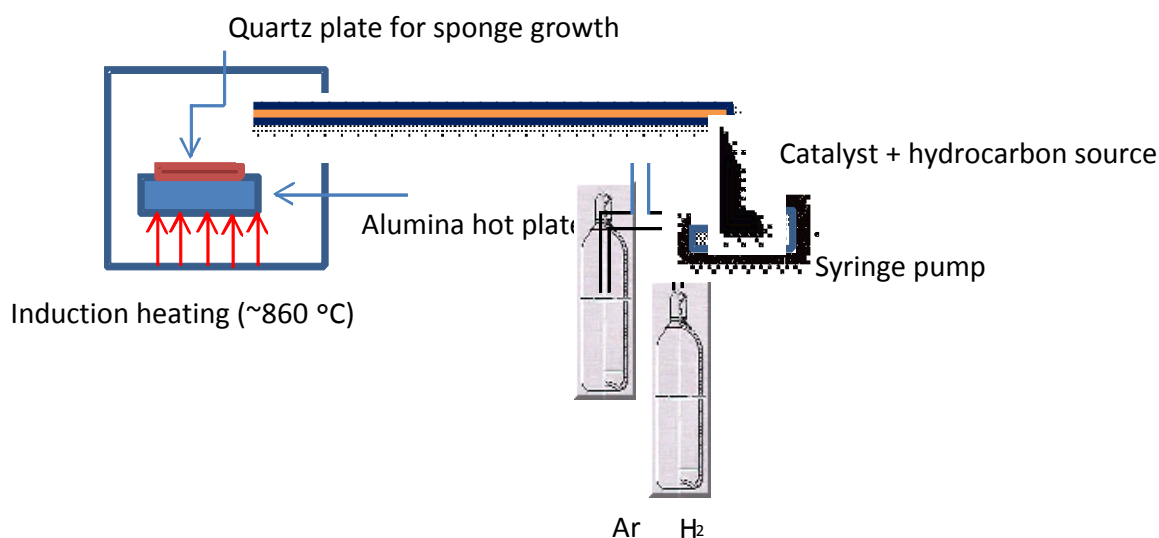
#### Materials

Three-dimensional network of CNT was prepared by chemical vapor deposition [8] (CVD) method with slight modifications. Furnace for synthesis of CNT matrix was well designed and fabricated. Thermal Mass Flow Controllers (FM1-V01-FAA-22-V-S) were purchased from Bronkhorst Hitec B.V., Netherlands. Ferrocene (powder), 1,2-dichlorobenzene, and Quartz plate (2-inch) were purchased from Alfa-Aesar England. Ferrocene powders were dissolved in 1,2-dichlorobenzene (0.06 g/mL).

#### Synthesis of CNT matrix

The solution of ferrocene (0.06 g/mL) with 1,2-dichlorobenzene was continuously injected (0.13 mL/min, using syringe pump) into a quartz plate (washed with acetone) placed in a silica tube housed inside the CVD furnace (diagrammatic representation is shown in Fig.1.). The reaction temperature was kept at 860 °C. Ar and H<sub>2</sub> were passed at a flowing rate of 2000 mL/min and 300 mL/min, respectively. After 5 hours, sponge-like CNT matrix was collected from quartz plate.

\*Corresponding authors. E-mail: [sudhaharie@gmail.com](mailto:sudhaharie@gmail.com), [kpsubhash@rediffmail.com](mailto:kpsubhash@rediffmail.com)

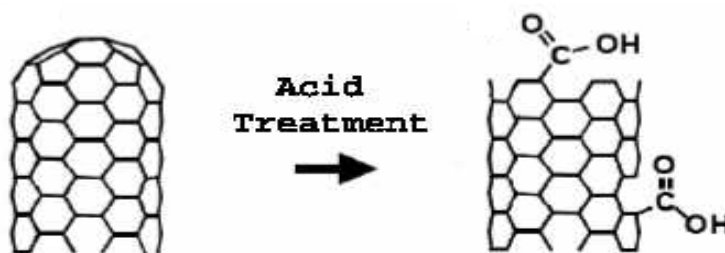


**Figure 1.** Experimental set-up for synthesis of carbon nanotube matrix.

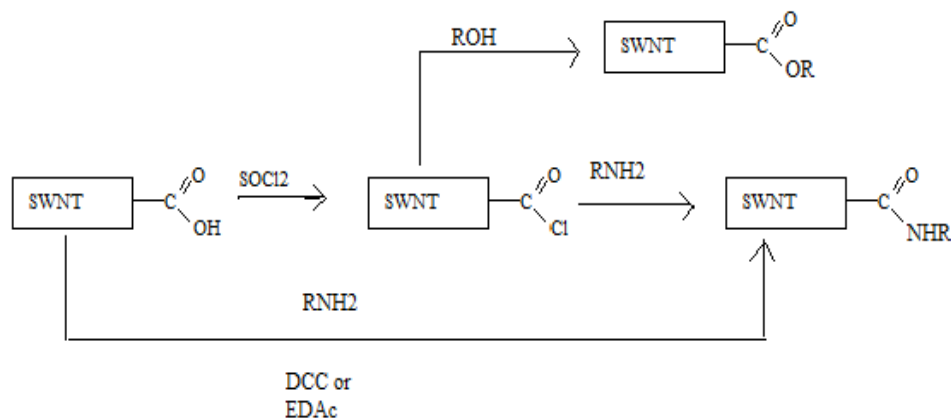
### Modification of CNT

Carboxyl group was introduced into the purified carbon nanotube support by refluxing it in 60 mL of 3 M  $\text{HNO}_3$  overnight [9]; during the process, carboxyl groups are formed at the ends of tubes as well as the defects on the sidewalls. The resulting mixture was cooled to room temperature, diluted with

water, and filtered through polycarbonate membrane ( $0.2 \mu\text{m}$ ). The oxidized CNT sponge thus produced was sonicated with ethylene diamine and DCC for 1 hour. It was washed with methanol ( $3 \times 20 \text{ mL}$ ) and dried in vacuum. Schematic representations of surface functionalization of carbon nanotubes are given in figures 2 and 3.



**Figure 2.** Acid treatment of carbon nanotube to obtain carboxylic acid end groups.



**Figure 3.** Scheme for Functional group modification of carboxylic acid functionalized single-walled carbon nanotubes (Carboxyl end-groups as a starting point for chemical modification).

### Test for absorption capacity of pristine CNT matrix

CNT matrix is cut into small pieces and an initially weighed sample is put into a syringe with Teflon sealing in one end and 1 mL of required

solvent is added and a residence time of 20 minutes is allowed. Excess solvent is removed and the weight of the full material is noted. It is found that functionalization decreases the Q value considerably. Test results are summarized in tables 1 and 2.

**Table 1.** Observed Q value of pristine sample in different solvents.

S.I No.	solvent	density g/cm <sup>3</sup>	Initial wt.(w <sub>1</sub> )	Wt. after full (w <sub>2</sub> )	Q value (w <sub>2</sub> /w <sub>1</sub> )
1	Ethanol	0.790	0.0005	0.0678	135.60
2	Methanol	0.790	0.0612	0.1518	102.60
3	Toluene	0.864	0.0017	0.0751	44.18
4	Ethyl acetate	0.899	0.0129	0.1907	14.78
5	Water	0.997	0.0075	0.1578	21.04
6	DMF	0.984	0.0610	0.0964	1.58

**Table 2.** Observed Q value of –COOH functionalized sample.

S.I No.	Solvent	Initial wt (g)	Final wt (g)	Q value
1	Ethanol	0.0731	0.2945	27.745
2	Methanol	0.0747	1.4920	19.990
3	Toluene	0.0864	0.7554	8.743
4	Ethyl acetate	0.0899	0.2507	2.789
5	Water	0.0821	0.2845	3.465
6	DMF	0.0984	0.0235	0.238

### Testing of antimicrobial activity of CNT Matrix

Water filtered through CNT sponge and the following parameters are tested before and after filtration. Experimental values are provided in Table 3.

**Table 3.** Testing of water filter potential and antimicrobial activity of CNT Matrix.

Parameters tested	Before filtration	After filtration
pH	4.78	6.3
Conductivity	0.791 S/m	0.680 S/m
Turbidity	4.7 ntu	0.2 ntu
Iron content	0.32 mg	0.175 mg
<i>E. Coli</i> bacteria	20/100 mL	N/A

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### Surface characterization using SEM and FE-SEM

Microstructure characterization of CNT matrix was done by transmission electron microscope (TEM) analysis using Tecnai G220 S-TWIN instrument at an accelerating voltage 200 kV. The solution was drop-casted on to the grid and was dried under vacuum. SEM analysis was performed using Hitachi model S3000-H and TESCAN model VEGA3. The CNT

Matrix samples were cut into required size and viewed with respect to various magnifications without any surface treatment. Field Emission-Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) analysis was performed by using SUPRA 40VP model of Carl Zeiss make having EDX attachment of OXFORD make. The same sample as used for SEM analysis was taken for FE-SEM analysis (Fig.4).

### Texture and elemental analysis by EDXA

The relative abundance of various elements in the deposited sample was analyzed by energy-dispersive X-ray analysis (EDX) using OXFORD make (Table 4). EDX analysis of CNT matrix is shown in Fig. 5.

**Table 4.** Relative abundance of various elements in the deposited sample.

Element	Weight%	Atomic%	Compd %	Formula
C K	27.26	33.31	99.88	CO <sub>2</sub>
Si K	0.05	0.03	0.10	SiO <sub>2</sub>
Cl K	0.02	0.01	0.00	
O	72.67	66.66		
Totals	100.00			

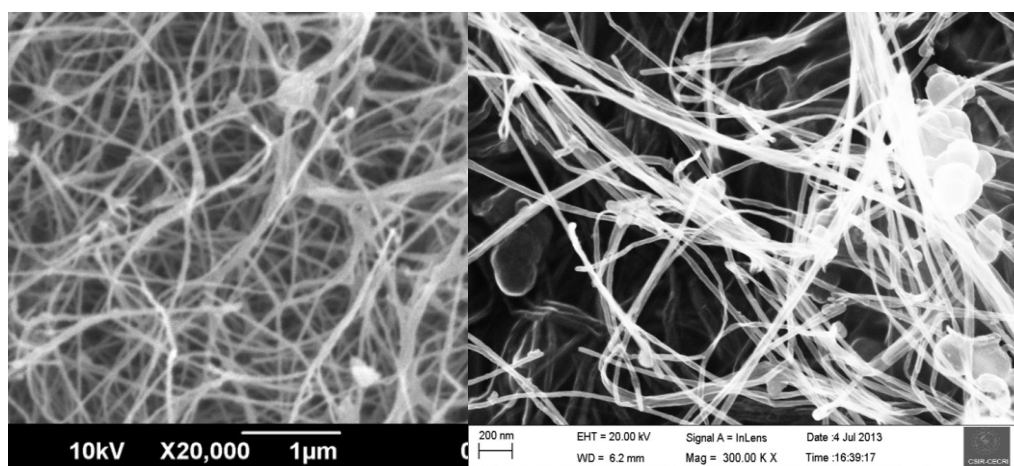


Figure 4. SEM and FE-SEM of carbon nanotubes matrix.

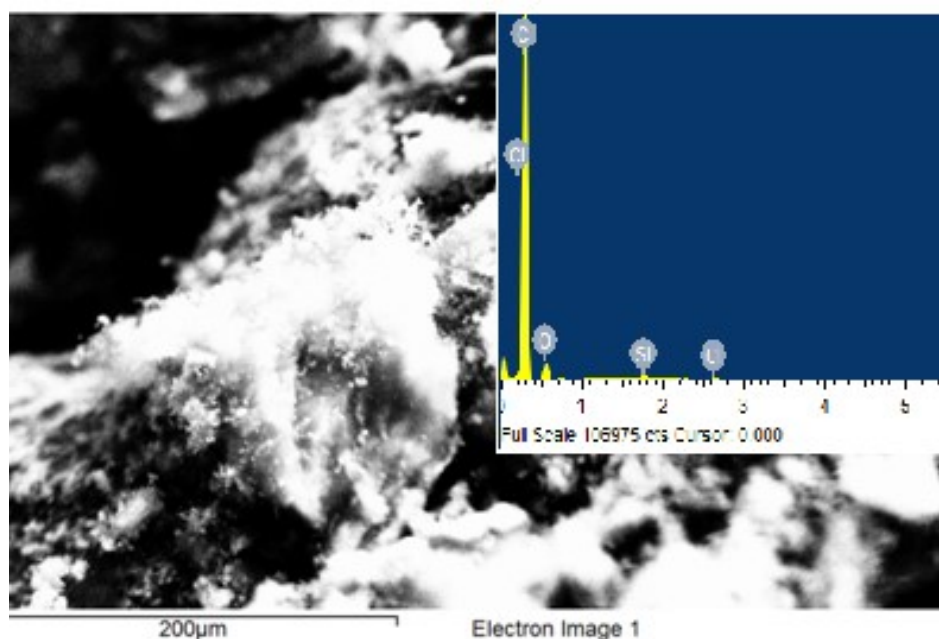


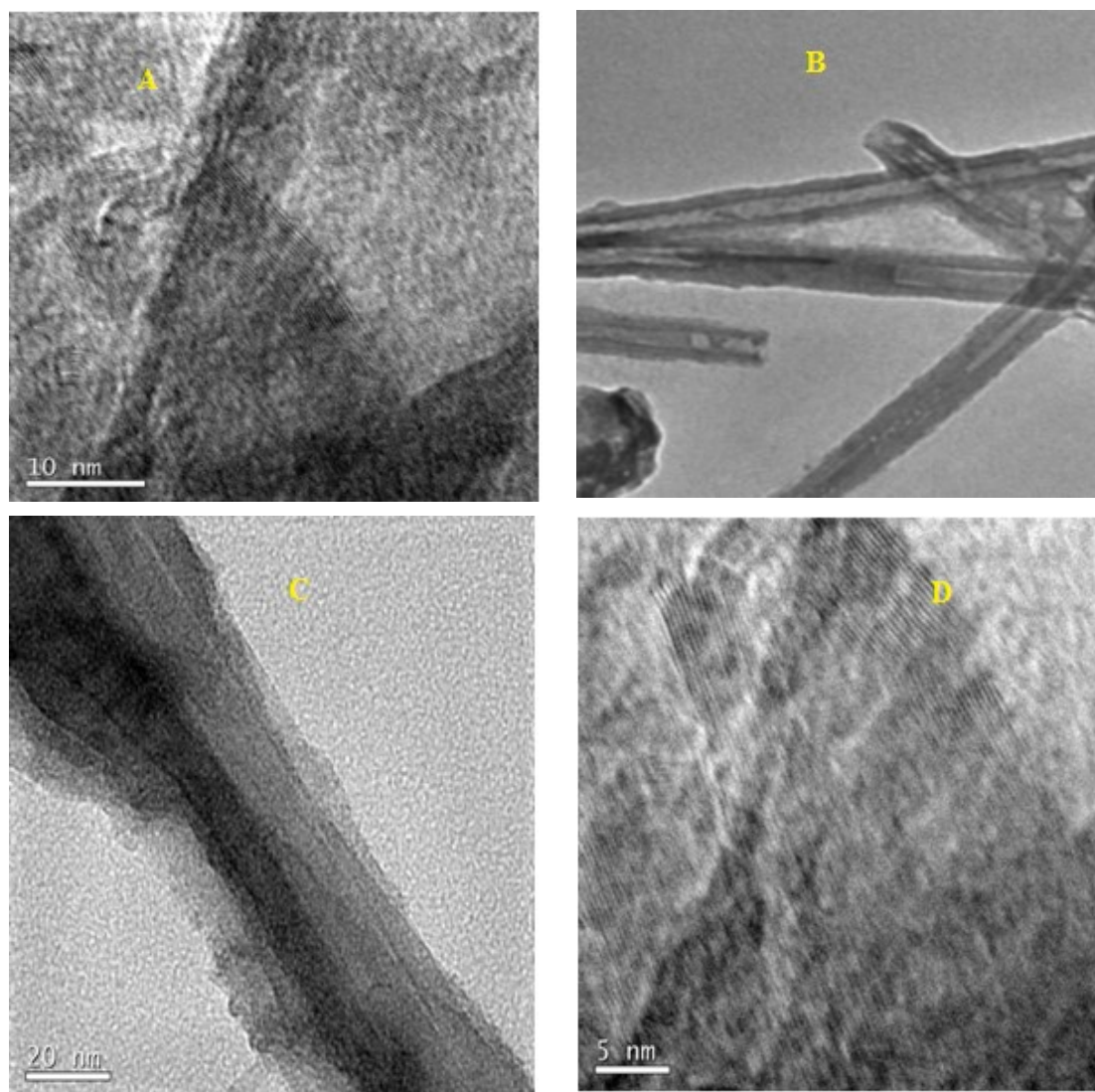
Figure 5. EDX Analysis of CNT matrix.

### TEM analysis

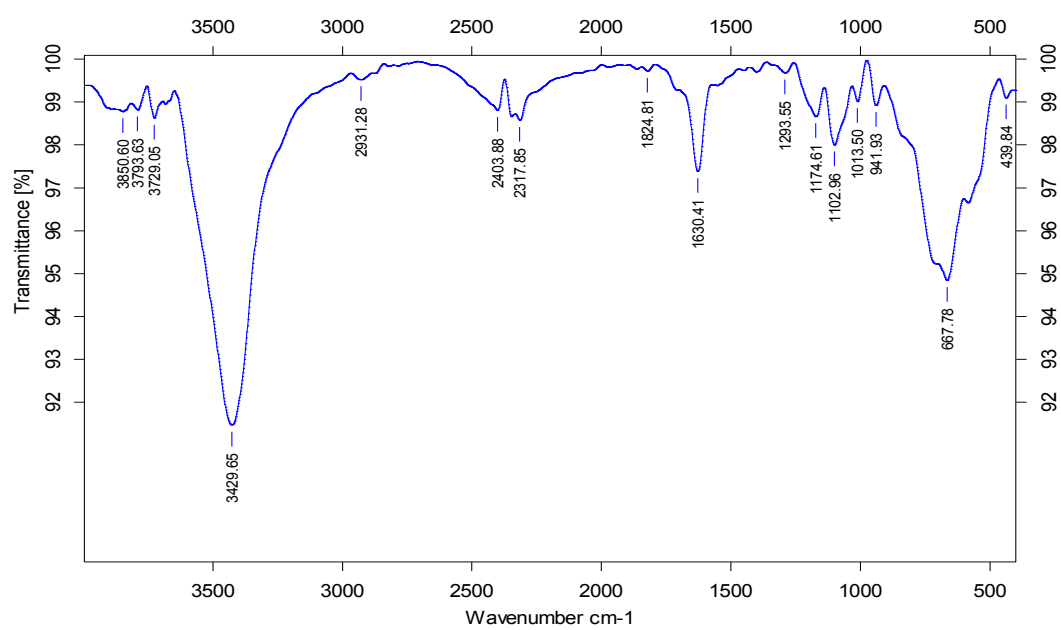
TEM analysis of the CNT was performed to know the side-wall functionalization and the modification in the tube morphology. TEM analysis shows that the outer walls of CNT were functionalized and there was no destruction to the tube morphology. Although there occurs tube breakage due to agitation or sonication employed during the preparation of the bath. The layers of CNT were not thinned as shown in Figure 6B. The overlapping of CNT walls was clear from TEM analysis. CNT tube structure was not damaged and the agglomeration of CNT was controlled through functionalization.

### FT-IR Analyses

FT-IR measurements of functionalized CNT Matrix were done. The extent of carboxylation affected to the surface of CNT can be assigned to these type peaks. A noticeable peak in the range from  $2800\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  corresponds to  $\nu(\text{C-H})$  stretching. It implies to the stability of CNT suspension in the aqueous medium. The peak at around  $3400\text{ cm}^{-1}$  corresponds to  $\nu(\text{-OH})$  stretching. This peak can be assigned to the hydroxyl group from moisture, alcohol or carboxylic groups. From FT-IR analysis it is clear that functionalization of CNT was effective (Fig. 7).



**Figure 6.** TEM images of single CNT (MWNT) strand and CNT network.

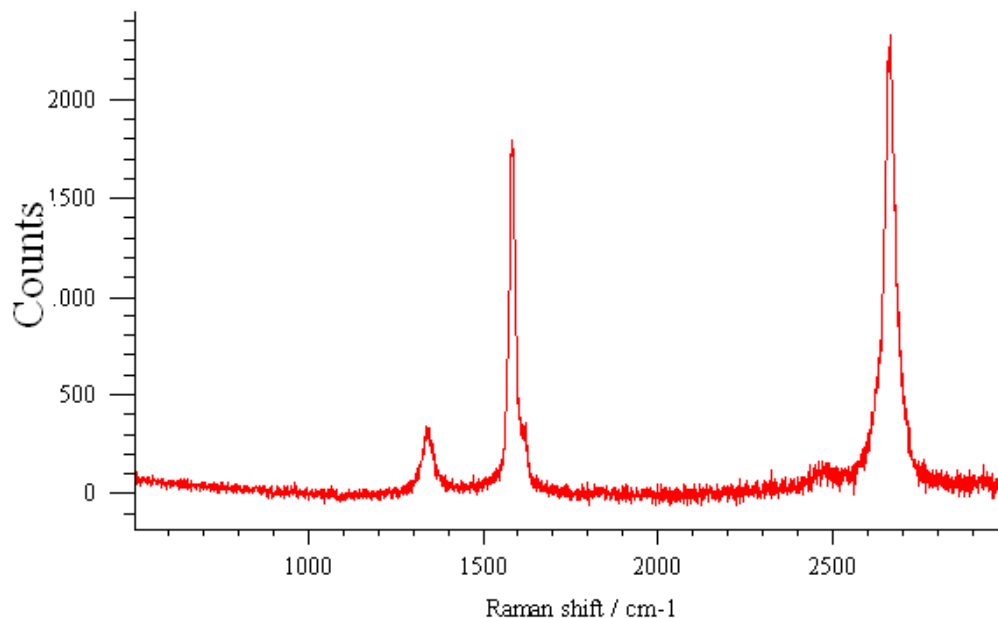


**Figure 7.** FT-IR of Carboxy-functionalized CNT network.

### Raman analysis

The Raman spectra showed G and D band features characteristic for carbon as CNT incorporated within the matrix as shown in Figure 6. The peak at  $\sim 1480\text{ cm}^{-1}$  shows the disorder-induced D band and that for the tangential G band the peak is at  $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ . Absence of prominent radial breathing modes in the

Raman spectra was noted for all scans. The ratio of G and D band is a good indicator of quality of CNT. In the present case the peak intensity of D and G band are comparable revealing that the structural defects within the CNT were less after functionalization. The Raman spectroscopy results thus confirm the presence of multi-walled carbon nanotubes in the CNT matrix (Fig. 8).



**Figure 8.** Raman spectrum of carboxy-functionalized CNT network.

## 4. CONCLUSION

To conclude, we have successfully synthesized the CNT matrix and modified by functionalization, and tested for efficiency as water filter and as solid support, as it can adsorb organic solvents better than the commonly used polymer resin-based solid support. The CNT matrix formed and functionalized is characterized SEM, FE-SEM, TEM, FT-IR, RAMAN spectra and EDX analysis.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Department of Science and Technology, Govt. of India under WOS-A Scheme. The authors acknowledge Dr. R. M. Panicker (CSIR-Central Electrochemical Research Institute, Karaikudi), Dr. C. Arunan (KSCSTE, Kerala), Dr. R. Micheal (Carlsberg University, Copenhagen), and Dr. C. P Vinod (NCL, Pune) for

their support and guidance.

## 6. REFERENCES AND NOTES

- [1] Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56. [[CrossRef](#)]
- [2] Planeix, J. M.; Coustel, N.; Coq, B.; Brotons, V.; Kumbhar, P. S.; Dutartre, R. *J Am Chem Soc*, **1994**, *116*, 7935. [[CrossRef](#)]
- [3] Che, G. L.; Lakshmi, B. B.; Fisher, E. R.; Martin, C. R. *Nature* **1998**, *393*, 346. [[CrossRef](#)]
- [4] Calvert, P. *Nature* **1999**, *399*, 210. [[CrossRef](#)]
- [5] Gui, X.; Wei, J.; Wang, K.; Cao, A.; Zhu, H.; Jia, Y.; Shu, Q.; Wu, D. *Adv. Mater.* **2009**, *22*, 617.
- [6] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C.; Prato, M. *Chemical Communications* **2004**, *130*, 571. [[CrossRef](#)]
- [7] Koshio, A.; Yudasaka, M.; Zhang, M.; Iijima, S. *NanoLett.* **2001**, *1*, 361. [[CrossRef](#)]
- [8] Hoebeke, J.; Graff, R.; Briand, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6160. [[CrossRef](#)]
- [9] Rosca, I. D.; Watari, F.; Uo, M.; Akaska, T. *Carbon* **2005**, *43*, 3124. [[CrossRef](#)]



## Synthesis of 4-Triazolylamino- and 4-Benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-Benzopyran-2-ones and their Antimicrobial Activity

Ramiz Hoti<sup>a\*</sup>, Aferdita Nura-Lama<sup>a</sup>, Gjyle Mulliqi-Osmani<sup>b</sup>, Naser Troni<sup>a</sup>, Fatbardh Gashi<sup>a</sup>, Hamit Ismaili<sup>a</sup>, and Veprim Thaçi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Nature Sciences – Department of Chemistry, University of Prishtina, “Mother Teresa” street, nn. 10000 Prishtina, Kosovo

<sup>b</sup>Institute of Public Health of Kosovo, “Rrethi i Spitalit” nn. 10000 Prishtina, Kosovo

Article history: Received: 07 February 2014; revised: 13 June 2014; accepted: 23 June 2014. Available online: 01 October 2014.

**Abstract:** Novel substituted benzopyran-2-one derivatives were synthesized by catalytic condensation reactions under reflux conditions. 4-(1,2,4-Triazolyl-3-amino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(a-b)** were synthesized by condensation of 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**2**) and corresponding 3-aminotriazoles **3(a-b)**. 4-(4'-methoxy-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4c**), 4-(6'-nitro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4d**) and 4-(6'-fluoro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4e**) were synthesized by condensation of 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**2**) and corresponding 2-aminobenzothiazole **3(c-e)** under reflux reaction conditions. Further, alkali hydrolysis of **4(a-e)** afforded the 2-hydroxy- $\omega$ -nitroacetophenone (**5**). Antimicrobial activity of products **4(a-e)** against *S. aureus*, *E. coli* and *Klebsiella* were investigated measuring of inhibition zones around the discs which are marked with DMF, concentration 2 mg/mL, 4 mg/mL and 6 mg/mL solutions. Compounds **4c**, **4e** and **4d** were more active against *S. aureus*. Emphatic activity against *E. coli* exhibited compounds **4b** and **4e**, whereas **4c** and **4d** were more active against *Klebsiella*.

**Keywords:** benzopyran-2-one; triazolylamine; benzothiazolylamine; antibacterial activity

### 1. INTRODUCTION

2H[1]-Benzopyran-2-one derivatives are heterocyclic oxygen compounds which find wide usage in pharmacy [1]. Many of them are plant components and play an important role in various processes of life. A significant number of them show different biological activities [2-3] as antimicrobial [4-6], antioxidant [7-9], antifungal [10-11], antimalarial [12-14] and hepatoprotective activities [15-17]. Many of substituted benzopyran-2-one derivatives showed anticoagulant, HIV protease [18] inhibition, sedative, analgesic and antitubercular [19] activity. Biological activity of these derivatives is conditioned by their structure. The presence of different substituents on benzopyran ring shows impact on the type and potency of biological activity. Despite efforts to find sufficient connection between the structure and biologic activity of these derivatives, until now there was no such general connection. Extraordinary biological importance of such

derivatives has generated a great interest in their synthesis. In support of this, these compounds are the subject of study by many researchers. In continuation of our previous studies and our attempts for synthesis of new derivatives [20-21], in this paper we aimed to synthesize some new derivatives by condensation reaction of condensation reaction of 4-chloro-3-nitrobenzopyran-2-one and heteroarylamines, and through other condensation reactions, who could serve as parapharmaceutical products.

### 2. MATERIAL AND METHODS

All experiments were carried out in acetonitrile as an aprotic solvent, under reflux reaction conditions. The reactions were monitored by TLC using Merck Kieselgel-60 (F-254) on benzene:toluene:glac. acetic acid bath (ratio 85:10:5, by volume, and observed by UV-lamp). Purification of products was done by recrystallization from various solvents. Melting points

\*Corresponding author. E-mail: [ramizhoti@yahoo.com](mailto:ramizhoti@yahoo.com).

were measured on a paraffin oil bath in open capillary tubes and they were not corrected. The IR spectra were recorded in KBr discs on a Shimadzu 8400S FTIR Spectrometer with 4 cm<sup>-1</sup> resolution. <sup>1</sup>H-NMR spectra were obtained in DMSO-d<sub>6</sub> on UNITYplus-500 "NMR 1" Spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane as an internal standard (δ0.00). Microanalyses were performed on a Perkin-Elmer 240 B CHN analyzer.

Antibacterial activity of compounds were screened applying the Kirby-Bayers method (discs d=5.5 mm, max. capacity 10 µg), measuring of inhibition zones around the discs which are marked with DMF, concentration 2 mg/mL, 4 mg/mL and 6 mg/mL solutions) were investigated.

#### 4-Triazolylamino- and 4-benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones 4(a-e), (general procedure)

In a typical reaction, 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one **2**, equimolar amounts of 3-aminotriazole **3(a-b)**, respectively 2-aminobenzothiazole **3(c-e)** and a catalytic amount of triethylamine in acetonitrile were refluxed in a water bath for 1–16 h. The product was filtered off under vacuum and the crude product was purified by recrystallization.

#### 4-(5-Mercapto-1,2,4-triazolyl-3-amino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (4a)

A mixture of 4-chloro-3-nitro-2H-1-benzopyran-2-one **2** (0.22 g, 1 mmol) in acetonitrile (5 mL) and 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole **3a** (0.115 g, 1 mmol) in acetonitrile (15 mL), containing triethylamine (two drops) was refluxed in a water bath. A CaCl<sub>2</sub> guard tube was mounted and the reaction mixture was stirred under reflux for 6 h and then cooled at room temperature. The crude product was filtered off under vacuum, then washed with two portions of 0.5 mL acetonitrile, and dried. Finally crude product was crystallized from methanol yielding 0.20 g (68%) of grey crystalline product **4a**, mp >270 °C.

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3345, 3116, 3077, 2913, 2721, 1688, 1672, 1613, 1524, 1420, 1305, 1204, 750, 705. **<sup>1</sup>H-NMR** (δ): 9.80 (s, 1H), 7.65 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.6 Hz, *J*<sub>2</sub>=2 Hz, 1H), 7.25 (d, *J*=2 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.5 Hz, *J*<sub>2</sub>=2 Hz 1H), 4.60 (s, 1H), 2.10

(s, 1H). **<sup>13</sup>C-NMR** (δ): 164.5, 151.6, 147.2, 145.5, 144.9, 128.1, 125.3, 125.0, 124.9, 119.6, 114.1. **Anal:** Calculated for C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: (C, 43.28%), (H, 2.31%), (N, 22.95%), (O, 20.97%), (S, 10.49%). **Found:** (C, 43.35%), (H, 2.39%), (N, 22.84%), (S, 10.37%).

#### 4-(5-Carboxy-1,2,4-triazolyl-3-amino) -3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (4b)

To 3-amino-5-carboxy-1,2,4-triazole hemihydrate **3b** (0.62 g, 4.62 mmol) in 40 mL of acetonitrile solution, triethylamine (0.5 mL) and 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one **2** (1 g, 4.6 mmol) was added. The mixture was heated slightly and refluxed for 3 h then cooled on an ice bath. The crude product was filtered off under vacuum, washed with acetonitrile (3 x 0.5 mL) and dried. Recrystallization from methanol gave 0.68 g (47%) of green crystalline product **4b**. mp > 270 °C

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3345, 3283, 3160, 2910, 1735, 1611, 1560, 1545, 1499, 1375, 1335, 1238, 1200, 766. **<sup>1</sup>H-NMR** (δ): 11.20 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 7.70 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J*=2 Hz, 1H), 7.50 (m, 2H), 4.30 (s, 1H). **<sup>13</sup>C-NMR** (δ) 167.6, 157.6, 154.5, 153.6, 152.4, 150.6, 125.9, 125.6, 125.3, 124.9, 122.9, 104.0. **Anal:** Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: (C, 45.42%), (H, 2.23%), (N, 22.08%), (O, 30.27%). **Found:** (C, 45.33%), (H, 2.12%), (N, 21.99%).

#### 4-(4-Methoxy-2-benzothiazolyl amino)-3-nitro-2H-1-benzopyran-2-one (4c)

A mixture of 4-chloro-3-nitro-2H-1-benzopyran-2-one **2** (0.221 g, 1 mmol) and 2-amino-4-methoxy-benzothiazole **3c** (0.180 g, 1 mmol), containing triethylamine (three drops) in acetonitrile (5 mL) was refluxed on a water bath. A CaCl<sub>2</sub> guard tube was mounted and after 15 min. a yellow crystalline product was formed. The reaction mixture was stirred under reflux for 2 h, then cooled to room temperature and filtered off under vacuum. The residue was washed with 2 x 1 mL portions of acetonitrile. Recrystallization from methanol gave 0.32g (87%) of yellow crystalline product **4c**, mp = 219 °C.

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3325, 3177, 2940, 1709, 1646, 1596, 1481, 1367, 1281, 1041, 764. **<sup>1</sup>H-NMR** (δ): 7.92 (d, *J*=6.5 Hz, 1H), 7.84 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.74 (t, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.28 (m, 2H), 7.16 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.03 (d, *J*=2 Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). **<sup>13</sup>C-NMR** (δ): 162.4, 146.5, 134.6, 132.1, 126.6, 125.7, 125.1,

124.5, 124.3, 122.9, 117.2, 116.1, 114.6, 114.5, 109.4, 109.3, 56.2. **Anal:** Calculated for  $C_{17}H_{11}N_3O_5S$ : (C, 55.27%), (H, 3.00%), (N, 11.37%), (O, 21.67%), (S, 8.67%). Found: (C, 55.47%), (H, 3.02%), (N, 11.26%), (S, 8.72%).

#### 4-(6-Nitro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (4d)

2-Amino-6-nitrobenzothiazole **3d** (0.7 g, 3.55 mmol) was added to a 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**2**) (0.8 g, 3.55 mmol) in 12 mL of acetonitrile solution, then three drops of triethylamine was added. The mixture was heated slightly and then refluxed for 16 h. The crude product was filtered off under vacuum and washed with 2 mL of acetonitrile. Recrystallization from ethanol gave 0.78 g (56%) of 4-(6-nitro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one **4d** as orange crystalline product. **mp** = 205–207 °C.

**IR** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3280, 3107, 2740, 1695, 1632, 1580, 1521, 1460, 1355, 1210, 1080, 900, 775. **<sup>1</sup>H-NMR** ( $\delta$ ): 8.69 (s, 1H), 8.30 (d,  $J=6.8$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.19 (d,  $J=2$  Hz, 1H), 4.97 (s, 1H). **<sup>13</sup>C-NMR** ( $\delta$ ): 171.8, 167.5, 157.6, 156.4, 132.5, 141.1, 132.7, 130.7, 125.6, 123.0, 122.3, 120.6, 118.1, 116.5, 116.1, 115.8.

#### 4-(6-Fluoro-2-benzothiazolamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one 4e

To a solution of 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**2**) (0.6 g, 2.66 mmol) in 5 mL acetonitrile, 2-amino-6-fluorobenzothiazole (**3e**) (0.45 g, 2.66 mmol) in acetonitrile (6 mL) and three drops of triethylamine was added under vigorous stirring. Immediately a yellow crystalline product was formed, then the mixture was stirred for 2 h under reflux. The crude product was filtered off under vacuum and then washed with acetonitrile (2 mL) and ethanol (1 mL). Recrystallization from absolute ethanol gave 0.9 g (95% yield) of orange crystalline product of 4-(6-fluoro-2-benzothiazolamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4e**), **mp** = 211–213 °C.

**IR** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3430, 3270, 3082, 1719, 1625, 1497, 1475, 1360, 1290, 922, 750. **<sup>1</sup>H-NMR** ( $\delta$ ): 8.76 (s, 1H), 7.88 (d,  $J=6.6$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J=6.6$  Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.20 (d,  $J=2$  Hz, 1H), 4.76 (s, 1H). **<sup>13</sup>C-NMR** ( $\delta$ ): 168.3, 167.6, 159.3, 156.9, 152.5, 140.5, 132.1, 127.8, 125.6, 123.0, 122.2, 120.5, 116.4, 116.1, 114.4, 109.5.

#### 2-Hydroxy- $\omega$ -nitroacetophenone (5)

Heteroaryl-amino-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(a-e)** (2 mmol) was dissolved in a 10 mL aqueous 5% sodium hydroxide solution and heated at 95 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled and acidified with diluted hydrochloric acid and ice to  $pH=1$ . The crude product was filtered off and washed with 3 x 2 mL portions of water. Recrystallization from ethanol gave 0.3 g, (84%) of product **5**, **mp** = 106–107 °C (lit. **mp** = 105–106 °C).

**IR** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3400, 3085, 2950, 1637, 1613, 1560, 1449, 1369, 754.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

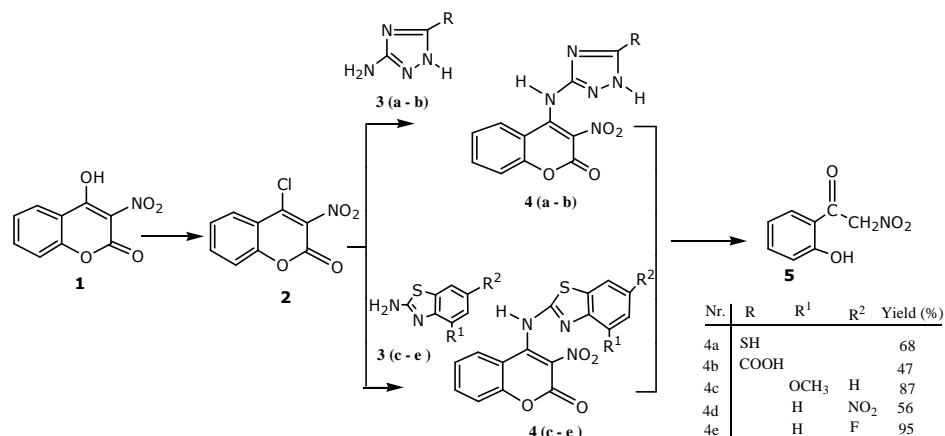
Our study on physiologically active compounds shows a preparative method for obtaining new substituted benzopyran-2-ones via condensation reactions. We report that 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2 one (**2**) reacts readily with various substituted aminotriazoles and 2-aminobenzothiazoles to form the corresponding 4-triazolylamino-, respectively 4-benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(a-e)**.

4-Chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2 one (**2**) was obtained in 92% yield by reacting equimolar amounts of 4-hydroxy-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**1**) with phosphorus oxychloride and *N,N*-dimethylformamide [24]. Product **2** was subjected to condensation with substituted aminotriazoles **3(a-b)** and 2-aminobenzothiazoles **3(c-e)** in acetonitrile under reflux to yield the respective 4-triazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(a-b)** and 4-benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(c-e)**.

Condensation of **2** with 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole (**3a**) in acetonitrile solution under reflux yielded 4-(5-mercapto-1,2,4-triazolyl-3-amino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4a**). Similarly, treatment of **2** with 3-amino-5-carboxy-1,2,4-triazole (**3b**) gave 4-(5-carboxy-1,2,4-triazolyl-3-amino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4b**). Moreover, compound **2** reacts with 2-amino-4-methoxybenzothiazole (**3c**), to afford 4-(4-methoxybenzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4c**). When compound **2** reacts with 2-amino-6-nitrobenzothiazole (**3d**) gives 4-(6-nitro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4d**) and when it reacts with 2-amino-6-fluorobenzothiazole (**3e**) in the presence of

catalytic amount of triethylamine gives 4-(6-fluoro-2-benzothiazolylamino)-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**4e**). Alkali hydrolysis of the products **4(a-e)** affords 2-hydroxy- $\omega$ -nitroacetophenone (**5**).

By tautomerization of precursors of the product **5** an imine intermediate was formed. Then, reaction is followed by imine hydrolysis and decarboxylation respectively (See Scheme 1).



Scheme 1

The structure of the resulting products was analyzed using IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra, as well as their elemental analysis.

Formation of **4a** was confirmed by using <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) spectrum. A proton singlet at  $\delta$ 2.10 ppm corresponds to S-H proton, the proton doublet at  $\delta$ 7.65 ppm, corresponds to H-5 and doublet at  $\delta$ 7.25 ppm resulted from H-8 of benzene ring. The spectrum also displayed a doublet of doublet at  $\delta$ 7.40 ppm resulted from aromatic H-6 and a doublet of doublet at  $\delta$ 7.10 ppm, from H-7. Signals at  $\delta$ 9.80 and  $\delta$ 4.60 ppm assigned for triazole NH and coumarin NH group also are displayed. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4a** showed characteristic absorptions responsible for 11 carbon atoms at  $\delta$ 164.5 ppm for C=O,  $\delta$ 151.6 and  $\delta$ 114.1 ppm for pyrone C,  $\delta$ 147.2 ppm and  $\delta$ 145.5 ppm for triazole C and  $\delta$ 144.9,  $\delta$ 128.1,  $\delta$ 125.3,  $\delta$ 125.0,  $\delta$ 124.9,  $\delta$ 119.6 ppm for aromatic C.

IR spectrum of **4a** is characterized with an absorption appearing at 3345 cm<sup>-1</sup> due to typical vNH stretching of secondary amines. IR spectrum of this product also showed the absorption modes at 3116-3077 and 2721 cm<sup>-1</sup> corresponding to vCH stretching of aromatic ring and vSH stretching of mercapto group. Typical vCO absorption of unsaturated six-membered lactones is observed at 1722 cm<sup>-1</sup>. Signals which are responsible for aromatic vC=N and vC=C vibrations appears at 1677 and 1613 cm<sup>-1</sup>, respectively. At 1420 and 1305 cm<sup>-1</sup> we see the absorptions of the stretching vNO<sub>2</sub> (as) and vNO<sub>2</sub>

(sym), and at 750 cm<sup>-1</sup> absorption of the bending  $\delta$ CH out of plane of the aromatic system were also appeared.

In the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound **4b**, appeared a doublet at  $\delta$ 7.70 ppm (assigned from H-5), a doublet at  $\delta$ 7.55 ppm, from H-8, and a multiplet at  $\delta$ 7.50 ppm responsible for H-6 and H-7. Two singlets at  $\delta$ 11.20 ppm and  $\delta$ 9.60 ppm correspond to OH and triazole NH proton absorptions, whereas a singlet at  $\delta$ 4.30 ppm resulted from coumarin NH.

In the <sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4b**, 12 characteristic absorptions are displayed at  $\delta$ 167.6 and  $\delta$ 157.6 ppm for COOH and C=O,  $\delta$ 154.5 and  $\delta$ 104.0 ppm for pyrone C,  $\delta$ 153.6 and  $\delta$ 152.4 ppm for triazole C and  $\delta$ 150.6,  $\delta$ 125.9,  $\delta$ 125.6,  $\delta$ 125.3,  $\delta$ 124.9,  $\delta$ 122.9 ppm for aromatic C.

IR spectrum of **4b** showed a broad absorption at 3250-3600 cm<sup>-1</sup> resulted from decoupled vNH (str) and vCOOH (str) vibrations. Signals at 3160 cm<sup>-1</sup> and at 2980 cm<sup>-1</sup> present the stretching of aromatic vCH (as) and vCH (sym) vibrations. A sharp peak at 1735 cm<sup>-1</sup> and the peaks at 1611 cm<sup>-1</sup> and 1560 cm<sup>-1</sup> are responsible for vCO str, vC=N and vC=C (ar), respectively. Two absorptions at 1545 cm<sup>-1</sup> and 1335 cm<sup>-1</sup> correspond to vNO<sub>2</sub> (as) and vNO<sub>2</sub> (sym), and the  $\delta$ CH bending (ip) and  $\delta$ CH bending (oop) mode at 1200 cm<sup>-1</sup> and 766 cm<sup>-1</sup> also were observed. A sharp peak at 1238 cm<sup>-1</sup> is responsible for  $\delta$ C-O of six-membered lactonic ring.

Formation of **4c** is identified from  $^1\text{H-NMR}$  (dms $o$ - $d_6$ ) spectrum where the absorption of a singlet at  $\delta 3.90$  ppm (3H, methoxy protons) appeared. The spectrum also displayed a signal at  $\delta 4.65$  ppm (s, 1H, assigned for NH), and for aromatic protons:  $\delta 7.92$  ppm (d, 1H, H $^{\prime}$ -5),  $\delta 7.84$  ppm (d, 1H, H $^{\prime}$ -7),  $\delta 7.74$  ppm (t, 1H, H $^{\prime}$ -6),  $\delta 7.28$  ppm (m, 2H, H-6 and H-7),  $\delta 7.16$  ppm (d, 1H, H-5) and  $\delta 7.03$  ppm (d, 1H, H-8) (H- benzopyrane-2-one aromatic protons, H $^{\prime}$ - benzothiazole aromatic protons).

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **4c** showed quality absorption peaks responsible for 17 carbon atoms at  $\delta 162.4$  ppm for C=O,  $\delta 146.5$ ,  $\delta 134.6$  ppm for benzopyrone C-N and benzothiazole C-N and  $\delta 132.1$ ,  $\delta 126.6$ ,  $\delta 125.7$ ,  $\delta 125.1$ ,  $\delta 124.5$ ,  $\delta 124.3$ ,  $\delta 122.9$ ,  $\delta 117.2$ ,  $\delta 116.1$ ,  $\delta 114.6$ ,  $\delta 114.5$ ,  $\delta 109.4$ ,  $\delta 109.3$ ,  $\delta 56.2$  ppm for aromatic benzothiazole and benzopyrone C.

In the IR spectrum for **4c** an absorption peak appeared at  $3325\text{ cm}^{-1}$  due to typical  $\nu\text{NH}$  stretching of secondary amines. Absorption at  $1709\text{ cm}^{-1}$  attributed to a typical  $\nu\text{CO}$  of unsaturated six-membered lactones was observed. IR spectrum of this product also showed the absorption modes at  $3000$ – $3190\text{ cm}^{-1}$  responsible for  $\nu\text{CH}$  stretching absorption of aromatic ring, at  $2940\text{ cm}^{-1}$  for  $\nu\text{CH}$  stretching of methoxy group and at  $1646\text{ cm}^{-1}$  and  $1596\text{ cm}^{-1}$  which are responsible for aromatic  $\nu\text{C}=\text{N}$  and  $\nu\text{C}=\text{C}$  (ar) absorption. At  $1481\text{ cm}^{-1}$  and  $1367\text{ cm}^{-1}$  for the stretching  $\nu\text{NO}_2$  (as) and  $\nu\text{NO}_2$  (sym), and at  $764\text{ cm}^{-1}$  for the bending  $\delta\text{CH}$  (ar) absorption peaks were also appeared.

The IR spectrum of **4d** showed a characteristic mode at  $3280\text{ cm}^{-1}$  as a result of  $\nu\text{NH}$  stretching absorption. The absorption peaks at  $3107\text{ cm}^{-1}$  are responsible for aromatic  $\nu\text{CH}$  stretching vibrations. The characteristic band which may have resulted from stretching carbonyl vibration was appeared at  $1695\text{ cm}^{-1}$ . Absorptions at  $1632\text{ cm}^{-1}$  and at  $1580\text{ cm}^{-1}$  are responsible for  $\nu\text{C}=\text{N}$  and  $\nu\text{C}=\text{C}$  (ar) vibrations. The absorption modes at  $1521\text{ cm}^{-1}$  and  $1355\text{ cm}^{-1}$  may be assigned to stretching  $\nu\text{NO}_2$  (as) and  $\nu\text{NO}_2$  (sym). Absorption for  $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$  of lactonic system appears at  $1210\text{ cm}^{-1}$ . A sharp peak at  $775\text{ cm}^{-1}$  resulted from aromatic  $\delta\text{CH}$  absorptions.

In the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **4d** two singlets at  $\delta 4.97$  ppm (1H, assigned from amine proton absorption) and at  $\delta 8.69$  ppm (1H, responsible for H $^{\prime}$ -7) were observed. Doublets at  $\delta 8.30$ ,  $\delta 7.88$ ,  $\delta 7.52$  ppm, and  $\delta 7.19$  ppm, correspond to aromatic H $^{\prime}$ -5, H $^{\prime}$ -4, H-5 and H-8, whereas a triplet signal at

$\delta 7.44$  ppm resulted from H-6 and H-7 protons' absorptions.

IR spectrum of **4e** showed the absorption at  $3430\text{ cm}^{-1}$  responsible for  $\nu\text{NH}$  stretching. The  $\nu\text{CH}$  stretching vibrations from aromatic ring appeared at  $3082\text{ cm}^{-1}$ . A sharp peak at  $1719\text{ cm}^{-1}$  and peaks at  $1625\text{ cm}^{-1}$  and  $1497\text{ cm}^{-1}$  responsible for  $\nu\text{CO}$  str.,  $\nu\text{C}=\text{N}$  and  $\nu\text{C}=\text{C}$  (ar) were observed. Two absorptions at  $1476\text{ cm}^{-1}$  and  $1360\text{ cm}^{-1}$  attributable to  $\nu\text{NO}_2$  (as) and  $\nu\text{NO}_2$  (sym), and the  $\delta\text{CH}$  (oop) mode at  $754\text{ cm}^{-1}$  also were observed. The peak at  $1275\text{ cm}^{-1}$  may have resulted from  $\nu\text{C}-\text{F}$  absorption of aromatic benzothiazole system. The  $\nu\text{C}-\text{O}$  of lactonic system is assigned at  $1350\text{ cm}^{-1}$ .

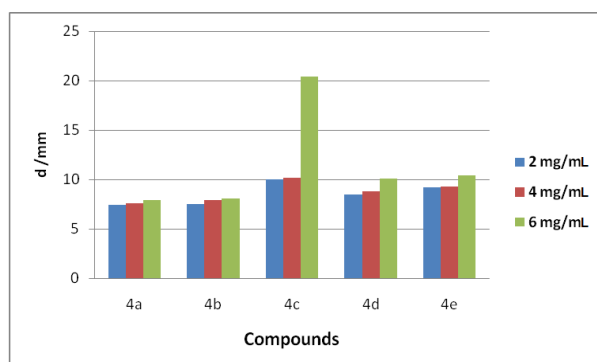
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **4e** showed a singlet at  $\delta 4.76$  ppm resulting from NH proton. Doublets at  $\delta 7.88$  and  $\delta 7.55$  ppm are responsible for H $^{\prime}$ -4 and H $^{\prime}$ -5 absorptions, whereas a singlet peak at  $\delta 8.76$  ppm resulted from H $^{\prime}$ -7 proton. A multiple peak at  $\delta 7.41$  ppm corresponds to aromatic H-6 and H-7, whereas doublets at  $\delta 7.63$  and  $\delta 7.20$  ppm resulted from H-5 and H-8 absorptions.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **4e** showed characteristic absorptions at  $\delta 168.3$ ,  $\delta 167.6$ , and  $\delta 159.3$  ppm for C=O, C $^{\prime}$ -2 and C-4. Characteristic peaks at  $\delta 156.9$ ,  $\delta 152.5$ ,  $\delta 140.5$  and,  $\delta 109.5$  ppm results from C $^{\prime}$ -7, C-O, C-N (benzothiazole) and C-3 whereas signals at  $\delta 132.1$ ,  $\delta 127.8$ ,  $\delta 125.6$ ,  $\delta 123.0$ ,  $\delta 122.2$ ,  $\delta 120.5$ ,  $\delta 116.4$ ,  $\delta 116.1$ ,  $\delta 114.4$  are responsible for aromatic carbon atoms.

Hydrolysis of products **4(a-e)** in alkaline media resulted in formation of 2-hydroxy- $\omega$ -nitroacetophenone (**5**). This argues that derivatives which contain benzopyran-2-one moiety are very sensitive to basic conditions. The characteristic IR absorptions of product **5** appeared at  $3080$ – $3400\text{ cm}^{-1}$  (a broad band) and  $2950\text{ cm}^{-1}$  which are responsible for  $\nu\text{OH}$  stretching,  $\nu\text{OH}$  (chelate), aromatic  $\nu\text{CH}$  and methylene  $\nu\text{CH}$  absorptions. The characteristic peak derived from lactonic carbonyl as a result of intramolecular hydrogen bond appears to have moved down at  $1637\text{ cm}^{-1}$ . In the IR spectrum of the hydrolysis product **5** also showed bands at  $1560\text{ cm}^{-1}$  for  $\nu\text{C}=\text{C}$  (ar),  $1449\text{ cm}^{-1}$  for  $\nu\text{NO}_2$  (as),  $1369\text{ cm}^{-1}$  for  $\nu\text{NO}_2$  (sym) and  $754\text{ cm}^{-1}$  aromatic  $\delta\text{CH}$  (oop). These values and melting point have been compared to the previous reported analysis [22] and show similar results.

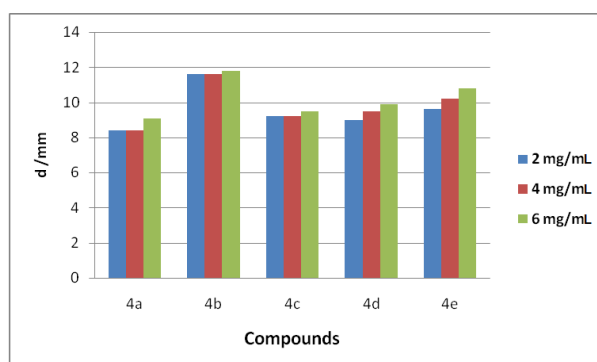
We also have examined the antibacterial activity of the synthetic compounds. Our investigation is directed toward testing their activity against *S.*

*aureus*, *E. coli* and *Klebsiella*. Applying the Kirby-Bayer method [23] we measured diameters of the inhibition zone around discs which are previously marked with DMF solutions of 2 mg/mL, 4 mg/mL and 6 mg/mL.

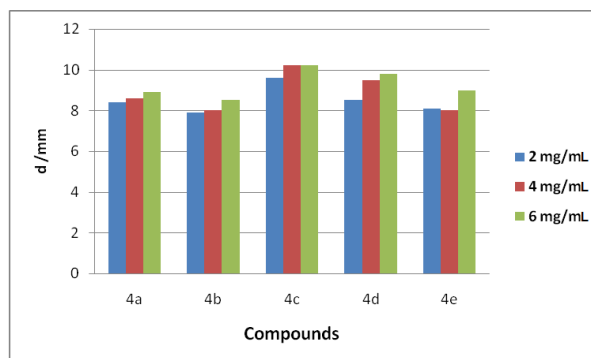
These derivatives have shown moderate to high activity against *S. aureus*, *E. coli* and *Klebsiella*. A series of methoxybenzothiazolyl- fluorobenzothiazolyl- and nitrobenzothiazolyl-derivatives were more active against *S. aureus*. Emphatic activity against *E. coli* exhibited triazolylcarboxylic- fluorobenzothiazolyl-derivatives, whereas methoxybenzothiazolyl- and nitrobenzothiazolyl-derivatives are more active against *Klebsiella*. Product **4c** was more active against *S. aureus* relative to compound **2** ( $d_{4c}/d_2=1.4-1.6$ ), whereas the same product was more active against *Klebsiella* ( $d_{4c}/d_2=1.2-1.5$ ). Furthermore, product **4b** was more active against *E. coli* ( $d_{4b}/d_2=1.5-1.9$ ). In general, increasing the concentration causes high activity against these microorganisms (figures 1, 2 and 3).



**Figure 1.** The diameters of the inhibition zones (mm) of the discs marked with various concentrations of the synthetic compounds **4(a-e)** for *S. aureus*



**Figure 2.** The diameters of the inhibition zones (mm) of the discs marked with various concentrations of the synthetic compounds **4(a-e)** for *E. coli*



**Figure 3.** The diameters of the inhibition zones (mm) of the discs marked with various concentrations of the synthetic compounds **4(a-e)** for *Klebsiella*.

#### 4. CONCLUSION

By catalytic condensation reaction of 4-chloro-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-one (**2**) and substituted aminotriazoles **3(a-b)** and 2-aminobenzothiazoles **3(c-e)**, 4-triazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(a-b)** and 4-benzothiazolylamino-3-nitro-2H-[1]-benzopyran-2-ones **4(c-e)** are synthesized in good yield. We may conclude that these derivatives have shown moderate to high activity against *S. aureus*, *E. coli* and *Klebsiella*. Compounds **4c**, **4e** and **4d** are more active against *S. aureus*. Emphatic activity against *E. coli* exhibited compounds **4b** and **4e**, whereas **4c** and **4d** are more active against *Klebsiella*. In general, products of series **4** are more active against these microorganisms relative to compound **2**. Increasing the concentration causes high activity against these microorganisms.

#### 5. REFERENCE AND NOTES

- [1] Rajasekaran, S.; Rao, G. K.; Pai, S.; Rajan A. *Int. J. ChemTech Res.* **2011**, *3*, 555.
- [2] Nagesan, M.; Raju, M. S.; Raju K. M. *J. Ind. Chem. Soc.* **1992**, *69*, 592.
- [3] Collota, V.; Cecehi, L.; Melani, F.; Filacchiani, G.; Martini G.; Gelli, S.; Lucacchi, A. *Farmaco* **1991**, *46*, 1139.
- [4] Arshad, A.; Osman, H.; Bagley, M. C.; Lam, C. K.; Mohamad, S.; Zahariluddin, A. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3788. [[CrossRef](#)]
- [5] Rehman, S.; Ikram, M.; Baker, R. J.; Zubair, M.; Azad, E.; Min, S.; Riaz, K.; Mok, K. H.; Rehman, S. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 68. [[CrossRef](#)]
- [6] Desai, N. C.; Satodiya, H. M.; Rajpara, K. M.; Joshi, V. V.; Vaghani, H. V. *Indian J. Chem.* **2013**, *52B*, 904. [[Link](#)]
- [7] Rodriguez, S. V.; Guñez, R. F.; Matos, M. J.; Santana L.; Uriarte, E.; Lapier, M.; Maya, J. D.; Azar, C. O. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 993. [[CrossRef](#)]

- [8] Osman, H.; Arshad, A.; Lam, C. K.; Bagley, M. C. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 32. [[CrossRef](#)]
- [9] Vianna, D. R.; Bubols, G.; Meirelles, G.; Silva, B. V.; Rocha, A.; Lanznaster, M.; Monserrat, J. M.; Garcia, S. C.; Poser, G.; Eifler-Lima, V. L. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 7260. [[CrossRef](#)]
- [10] Sardari, S.; Mori, Y.; Horita, K.; Micetich, R. G.; Nishibe, S.; Daneshtalab, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1933. [[CrossRef](#)]
- [11] Araújo, R. S.; Guerra, F. Q.; Lima, E.; Simone, C. A.; Tavares, J. F.; Scotti, L.; Scotti, M. T.; Aquino, T. M.; Moura, R. O.; Mendonça, F. J.; Barbosa-Filho, J. M. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *10*, 1293. [[CrossRef](#)]
- [12] Sashidhara, K. V.; Kumar, A.; Dodda, R. P.; Krishna, N. N.; Agarwal, P.; Srivastava, K.; Puri, S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *15*, 3926. [[CrossRef](#)]
- [13] Lin-Oan, Y.; Yi-Chang, N.; Oin-Mei, W.; Fa-Jun, N. *Biomed. Env. Sci.* **2006**, *19*, 367.
- [14] Sashidhara, K. V.; Kumar, A.; Dodda, R. P.; Krishna, N. N.; Agarwal, P.; Srivastava, K.; Puri, S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3926. [[CrossRef](#)]
- [15] Ahmed, B.; Khan, S. A.; Alam, T. *Pharmazie* **2003**, *58*, 173. [PMid:12685811]
- [16] Kostova I. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 29. [[CrossRef](#)]
- [17] Atmaca, M.; Bilgin, H. M.; Obay, B. D.; Diken, H.; Kelle, M.; Kale, E. *J. Physiol Biochem.* **2011**, *67*, 569. [[CrossRef](#)]
- [18] Bourinbaiar, A. S.; Tian, X.; Nagoxy, R. *Acta Virol.* **1993**, *37*, 241. [PMid:7905238]
- [19] Venugopali, K. N.; Jayashe, B. S. *Asian J. Chem.* **2004**, *16*, 407.
- [20] Hoti, R.; Mulliqi, G.; Bicaj, M.; Vehapi, I.; Gashi, F.; Troni, N.; Faiku, F.; Ismaili, H.; Breznica, P. *Aktet, Journal of Institute Alb-Shkenca* **2009**, *3*, 423.
- [21] Hoti, R.; Kalaj, V.; Bicaj, M.; Vehapi, I.; Le Nouen, D.; Vataj, R. *The Faseb Journal* **2006**, *20*, 49.
- [22] Venkateswara, R. K.; Sundaramurthy, V. *Proc. Indian Acad. Sci.* **1976**, *83A*, 238.
- [23] Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. *ASCP.* **1996**, *45*, 493.

## A Simple, Proficient and Green Approach for the Synthesis of 1,8-Dioxo-octahydroxanthenes Catalyzed by Cerium(IV) Ammonium Nitrate in Aqueous Media

Balasaheb. V. Shitole<sup>a</sup>, Nana V. Shitole<sup>b</sup>, and Gopal K. Kakde<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Vasant College Kaij-431518, India

<sup>b</sup>Shri Shivaji College, Parbhani-431401 MS, India

<sup>c</sup>Arts, Commers and Science College, Dharur(Kille)-431519, India

Article history: Received: 26 November 2013; revised: 14 August 2014; accepted: 01 September 2014. Available online: 01 October 2014.

**Abstract:** Various biologically important 1,8-dioxo-“octahydroxanthene derivatives” have been efficiently synthesized in excellent yields using catalytic amounts of cerium(IV) ammonium nitrate (CAN) in water. This inexpensive, non-toxic, and readily available catalytic system (10 mol%) in water efficiently catalyzes the condensation reaction of various aromatic aldehydes and dimedone to yield the products in excellent yield. Besides, ambient conditions, excellent product yields and water as a universal solvent display both economic and environmental advantages.

**Keywords:** eco-friendly; dimedone; green chemistry

### 1. INTRODUCTION

The development of efficient and environmentally benign processes for the preparation of biologically active molecules constitutes a major challenge for chemists working in the field of organic chemistry [1]. In addition, benign safe, readily available and environmentally friendly solvent, water has also been recognized as an effective reaction medium with unique properties and possibilities for many organic reactions [2].

In recent years, xanthenes are an important class of organic compounds that find use as dyes, fluorescent material for visualization of biomolecules and in laser technologies due to their useful spectroscopic properties [3]. Xanthenes have also received significant attention due to their useful biological and pharmacological properties, such as their antiviral [4], antibacterial [5], and anti-nociceptive activities [6], as well as their efficiency in photodynamic therapy [7] and anti-inflammatory activities [8]. There are several reports for the aldehydes using silica sulfuric acid [9], Dowex-50W [10], HClO<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> and synthesis of 1,8-dioxooctahydroxanthene derivatives by condensation

of dimedone and PPA-SiO<sub>2</sub> [11], silica chloride and NaHSO<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> [12], *p*-dodecylbenzenesulfonic acid [13], Fe<sup>3+</sup>-montmorillonite [14], amberlyst-15 [15], Iron(III) Hydrogen Sulfate [16], TMSCl [17], sodium dodecyl sulfate (SDS) [18], tetrabutylammonium hydrogen sulfate [19], hydrochloric acid [20], 1-methylimidazolium trifluoroacetate [21], 1-Butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulfate [bmim]HSO<sub>4</sub> [22] and halogen-free acyclic task-specific ionic liquids (TSILs) [23], silica-supported phosphorus pentoxide [24] and molecular iodine [25].

As part of our ongoing program to develop more efficient and environmentally benign methods for organic syntheses using economic and ecofriendly materials as catalysts, we have looked into the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes using catalytic amounts of CAN in water.

### 2. MATERIAL AND METHODS

Melting points were determined in an open capillary tube and are uncorrected. IR spectra were recorded in KBr on a Perkin-Elmer spectrometer. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Gemini 300-MHz instrument in CDCl<sub>3</sub> as solvent and TMS as an

\*Corresponding author. E-mail: [balasaheb.shitole72@gmail.com](mailto:balasaheb.shitole72@gmail.com)



internal standard. The purity of products was checked by thin-layer chromatography (TLC) on silica-gel.

### General Procedure for the synthesis of 1, 8-dioxo-octahydroxanthenes 3(a-l)

A mixture of an aromatic aldehyde (1 mmol), dimedone (2 mmol) and cerium(IV) ammonium nitrate (CAN) (10 mol%) in (20 mL) water was stirred at reflux temperature for 2-3 h. The progress of the reaction was monitored by TLC. After completion of reaction, the reaction mixture was cooled to room temperature, solid crude product has obtained. The obtained solid was filtered, dried and crystallized from ethanol.

### Spectroscopic data of synthesized some principal compounds

**Compound (3a):** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2961, 2873, 1660, 1624, 1590, 1485, 1450, 1361, 1241.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  0.99 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 1.11 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 2.14-2.23 (q,  $J = 15.86$  Hz, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 2.43 (s, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 4.68 (s, 1H, CH); 7.04-7.25 (m, 5H, Ar).

**Compound (3b):** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2965, 2850, 1660, 1624, 1590, 1470, 1450.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  0.99 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 1.11 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 2.10-2.23 (q,  $J = 16.61$  Hz, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 2.42 (s, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 4.63 (s, 1H, CH); 7.14-7.20 (m, 4H, Ar).

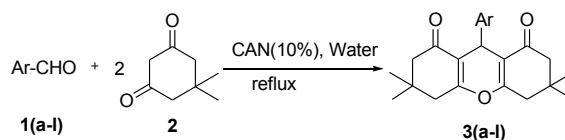
**Compound (3k):** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2990, 2870, 1662, 1632, 1557, 1470, 1430.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  1.03 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 1.11 (s, 6H,  $\text{CMe}_2$ ); 2.10-2.22 (q,  $J = 16.61$  Hz, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 2.40 (s, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ); 4.85 (s, 1H, CH); 7.13 -7.43 (m, 3H, Ar)

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

In continuation of our research work on the development of novel synthetic methodologies [30], herein, we would like to report a synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes in excellent yields. The reaction of a benzaldehyde as a representative aldehyde and dimedone in the presence of CAN has been considered as a standard model reaction for the optimization of reaction conditions (Scheme 1).

To evaluate the effect of solvent, various solvents such as ethanol:water (3:1,w:w), ethanol:water (2:1,w:w), ethanol:water (1:1,w:w) and water were used for the model reaction. The desired

product was obtained in 35, 47, 50, 57 and 90% yields, respectively, after 2 h at reflux condition. Water stand out as the solvent of choice among the solvents tested. Because of the rapid conversion and excellent yield (90%) of desired product obtained (Table 1, entry 5), where as the product formed in lower yields (35-57%) by using other solvents (Table 1, entries 1-4).



**Scheme 1.** Synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes

**Table 1.** Screening of solvents (1a).

Entry	Solvent	Yield (%)
1	Ethanol	35
2	Ethanol, Water (3:1)	47
3	Ethanol, Water (2:1)	50
4	Ethanol, Water (1:1)	57
5	water	90

The temperature had a critical effect on the reaction yield and at room temperature, only 20% amount of products in the reaction occurred even after two hours of stirring the reaction mixture. However, heating the reaction mixture at 40, 60, 80, 100°C afforded the product in 35, 55, 73 and 90% yield respectively (Table 2).

**Table 2.** Optimization of benzaldehyde derivatives with various temperatures (1a).

Sr. No.	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Reaction time (h.)	Yield (%)
1	RT	2	20
2	40	2	35
3	60	2	55
4	80	2	73
5	100	2	90

To determine the appropriate concentration of the catalyst CAN, It has been investigated the model reaction first without catalyst very less product is obtained (i.e. trace) At different concentrations of catalyst like 5, 7.5, 10, and 12.5 mol% the product formed in 58, 73, 90, and 90% yields respectively (Table 3).

**Table 3.** Optimization of the amount of CAN<sup>a</sup>

Entry	CAN (mol %)	Yield <sup>b</sup> (%)
1	5	58
2	7.5	73
3	10	90
4	12.5	90

<sup>a</sup>Reaction conditions: 1 (1 mmol), 2 (2 mmol), CAN in water at reflux temperature.; <sup>b</sup>Isolated yields

This indicates that 10 mol% of CAN is sufficient for the best result by considering the reaction time and yield of product. A role of CAN has been proposed to activate the carbonyl compound by

binding of CAN with the carbonyl oxygen which ultimately enhances the electrophilicity of the carbonyl carbon leads to increase in the reaction rate.

To study the generality of this process, variety of examples were illustrated for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and results are summarized in Table 4. The reaction is compatible for various substituents such as -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OH, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and -Cl. The formation of desired product has been confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and IR spectroscopic analysis techniques, and compared with the corresponding literature data.

**Table 4.** Synthesis of 1, 8-dioxo-octahydroxanthenes using CAN.

Sr No.	Ar-CHO	Product	Time (min)	Yield <sup>a</sup> (%)	M. P (°C)	
					Found	Reported
1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3a	125	90	204-206	206-207
2	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3b	150	95	230-232	230-231
3	4-OHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3c	135	91	246-247	245
4	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3d	155	87	204-205	205-206
5	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3e	130	94	227-228	228-230
6	3-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3f	125	78	180-182	182-184
7	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3g	100	95	220-222	221-223
8	4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3h	140	91	242-244	240-242
9	3-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3i	120	90	168-170	170-172
10	2-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3j	100	85	244-245	245-246
11	2,4 Cl-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3k	125	92	250-251	253-254
12	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH=CH	3l	130	93	175-177	176-177

<sup>a</sup>Reaction conditions: 1a-l (1 mmol), 2 (2 mmol), CAN (10 mol%) in water at reflux temperature. <sup>b</sup>Isolated yields.

#### 4. CONCLUSION

In conclusion, this paper describes a simple, proficient and green approach for the synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes catalyzed by cerium(IV) ammonium nitrate in aqueous media. Present methodology offers very attractive features such as simple experimental procedure, higher yields and economic viability, when compared with other method as well as with other catalysts, and will have wide scope in organic synthesis

#### 5. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Head Department of Chemistry, Deogiri College, Aurangabad-431 004 (MS), India, for providing the laboratory facility.

#### 6. REFERENCE AND NOTES

- [1] (a) Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2005**, *7*, 267. [CrossRef] (b) Anastas, P.; Williamson, T. *Green Chem. Frontiers in Benign Chemical Synthesis and Processes University Press, London* 1998; (c) Wangand, G. W.; Miao, C. B. *Green Chem.* **2006**, *8*, 1080. [CrossRef]
- [2] (a) Genetand, J. P.; Savignac, M. J. *Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 305. [CrossRef] (b) Shaughnessy, K. H.; Devasher, R. B. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 585. [CrossRef] (c) Leadbeater, N. E. *Chem. Commun.* **2005**, 2881. [CrossRef] (d) Li, C. J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3095. [CrossRef] (e) Herrerias, C. I.; Yao, X.; Li, Z.; Li, C. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2546. [CrossRef]
- [3] (a) Menchen, S. M.; Benson, S. C.; Lam, J. Y. L.; Zhen, W.; Sun, D.; Rosenblum, B. B.; Khan, S. H.; Taing, M. U.S. Patent, US6583168 2003; (b) Banerjee, A.; Mukherjee, A. K. *Stain Technol.* **1981**, *56*, 83.
- [4] Lambert, R. W.; Martin, J. A.; Merrett, J. H.; Parkes, K. E. B.; Thomas, G. J. PCT Int. Appl. WO 9706178, **1997**; *Chem. Abstr.* 126, p212377y **1997**.
- [5] Hideo, T. Jpn. Tokkyo Koho 56,005,480, 1981; *Chem. Abstr.* 95, 80922b **1981**.

- [6] Llama, E. F.; Campo, C. D.; Capo, M.; Anadon, M. *Eur. J. Med. Chem.* **1989**, *24*, 391. [[CrossRef](#)]
- [7] Ion, R. M.; Frackowiak, D.; Planner, A.; Wiktorowicz, K. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, *45*, 833.
- [8] Poupelin, J. P.; Saint-Rut, G.; Foussard-Blanpin, O.; Narcisse, G.; Uchida-Ernouf, G.; Lacroix, R. *Eur. J. Med. Chem.* **1978**, *13*, 67.
- [9] Seyyedhamzeh, M.; Mirzaei, P.; Blazgir, A. *Dyes Pigm.* **2008**, *76*, 836. [[CrossRef](#)]
- [10] Imani-Shakibaei, G.; Mirzaei, P.; Bazgir, A. *Appl. Catal. A: Gen* **2007**, *325*, 188. [[CrossRef](#)]
- [11] Kantevari, R.; Bantu, R.; Nagarapu, L. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *269*, 53. [[CrossRef](#)]
- [12] Das, B.; Thirupathi, P.; Reddy, K.; Ravikanth, B.; Nagarapu, L. *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 535. [[CrossRef](#)]
- [13] Jin, T. S.; Zhang, J. S.; Wang, A. Q.; Li, T. S. *Ultrason. Sonochem.* **2006**, *13*, 220. [[CrossRef](#)]
- [14] Song, G.; Wang, B. H.; Luo, Yang, L. *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 673. [[CrossRef](#)]
- [15] Das, B.; Thirupathi, P.; Mahender, I.; Reddy, V. S.; Rao, Y. K. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, *247*, 233. [[CrossRef](#)]
- [16] Shaterian, H.; Hosseinian, A.; Ghashang, M. *Turk. J. Chem* **2009**, *33*, 233.
- [17] Kantevari, S.; Bantu, R.; Nagarapu, L. *Arkivoc* **2006**, xvi, 136. [[Link](#)]
- [18] Bin, L. L.; Shou, J. T.; Sha, H. L.; Meng, L.; Na, Q.; Shuang, L. T. *E-J. Chem.* **2006**, *3*, 117.
- [19] Karade, H. N.; Sathe, M.; Kaushik, M. P. *Arkivoc* **2007**, xiii, 252. [[CrossRef](#)]
- [20] Cremllyn, R. J.; Saunders, D. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *81*, 73. [[CrossRef](#)]
- [21] Dabiri, M.; Baghbanzadeh, M.; Arzroomchilar, E. *Catal. Commun.* **2008**, *9*, 939. [[CrossRef](#)]
- [22] Niknam, K.; Damya, M. *J. Chin. Chem. Soc. (Weinheim, Ger.)* **2009**, *56*, 659. [[Link](#)]
- [23] Fang, D.; Gong, K.; Liu, Z. L. *Catal. Lett.* **2009**, *127*, 291. [[CrossRef](#)]
- [24] Hasaninejad, A.; Dadar, M.; Zade, A. *Chem Sci. Trans.* **2012**, *1*, 233. [[CrossRef](#)]
- [25] Murthy, M. N.; Rambabu, P.V.; Aeluri, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2186. [[CrossRef](#)]
- [26] More, S. V.; Sastry, M. N. V.; Yao, C. F. *Green Chem.* **2006**, *8*, 91. [[CrossRef](#)]
- [27] Shindalkar, S. S.; Madje, B. R.; Hangarge, R. V.; Shingare, M. S. *Ind. J. Chem.* **2005**, *44B*, 2409.
- [28] Chengji, X.; Wang, G. W.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Chin. Chem. Lett.* **2005**, *16*, 1327.
- [29] Kumar, R.; Joshi, Y. C. *E-J. Chem.* **2007**, *4*, 606.
- [30] (a) Shitole, N. V.; Shelke, K. F.; Sadaphal, S. A.; Shingate B. B.; Shingare, M. S. *Green Chem. Lett. Rev.* **2010**, *3*, 83. [[CrossRef](#)] (b) Shitole, N. V.; Sapkal, S. B.; Shingate, B. B.; Shingare, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 53. [[CrossRef](#)]