



Fundação Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

**DETERMINAÇÃO DA DANOFLOXACINA EM URINA BOVINA E SUÍNA POR
VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO
VÍTREO E ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS**

Chirley Vanessa Boone

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nivel de Mestrado – da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Físico-Química).

Orientador: Prof^o. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho
Coorientador: Prof^o. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade

Dourados – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B724d	<p>Boone, Chirley Vanessa</p> <p>Determinação da danofloxacin em urina bovina e suína por voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de carbono vítreo e eletrodos de pasta de carbono modificada. / Chirley Vanessa Boone. – Dourados, MS: UFGD, 2014.</p> <p>80f.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho.</p> <p>Dissertação (Curso de Pós-graduação em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Voltametria de onda quadrada 2. .Danofloxacin 3. Eletrodo de carbono. I. Título.</p> <p>CDD – 540.724</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Determinação da Danofloxacina em Urina Bovina e Suína por Voltametria de Onda Quadrada Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo e Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados", de autoria de Chirley Vanessa Boone, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.



Profª. Drª. Adriana Evaristo de Carvalho (Orientadora-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 14 de fevereiro de 2014

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”. (Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar capacidade de realizar este trabalho.

A profa. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho pela orientação e amizade.

Ao prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade pela coorientação neste trabalho.

Aos profs. Drs. Antônio Rogério Fiorucci e Rodrigo Amorim Bezerra da Silva, pelas contribuições durante a qualificação.

Ao prof. Dr. Claudio Teodoro Carvalho que disponibilizou os complexos, que foi de grande valia para a elaboração desse trabalho.

A todos os professores do mestrado em química da UFGD que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização dessa dissertação.

Aos colegas de laboratório, Amanda, Cícera, Iulle, Teresa, Vanessa, Eric, Maydla, Cíntia e aos colegas dos laboratórios vizinhos pelas conversas, risadas e amizade obtida nesses dois anos de mestrado.

Especial agradecimento a Uendinara, pelas horas e horas de conversa, discussão sobre pesquisa e pela amizade adquirida nesse tempo de pesquisa.

Agradecimento aos técnicos do laboratório Joelson e Wesley pelos inúmeros favores.

A minha amiga Raquel que sempre está do meu lado, seja pra chorar ou pra rir.

Aos meus pais que sempre mostraram que o estudo é o melhor caminho para o sucesso.

Ao meu esposo Adilson que sempre deu força para que eu me dedicasse a esse trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelos auxílios concedidos, como a bolsa do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Fluoroquinolonas	1
1.2. Métodos eletroanalíticos	5
1.2.1. Voltametria cíclica	6
1.2.2. Voltametria de onda quadrada	7
1.3. Importância do uso do surfactante	8
CAPÍTULO 2 – OBJETIVO	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivo Específico	13
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1. Reagentes, soluções e preparo dos EPC/EPCM	14
3.1.1. Reagentes e solventes	14
3.1.2. Soluções	14
3.2. Instrumentação	15
3.2.1. Equipamentos	15
3.1.1. Célula eletroquímica e eletrodos	16
3.3. Metodologia	18
3.3.1. Voltametria cíclica	18
3.3.2. Voltametria de onda quadrada	18
3.3.3. Espectrofotometria de UV/Vis	19
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Comportamento Eletroquímico	20
4.2. Otimização dos parâmetros experimentais	21
4.2.1. Estudo da porcentagem de metanol	21
4.2.2. Estudo do efeito do pH eletrólito suporte	23

4.2.3.	Estudo do efeito do surfactante	25
4.2.4.	Otimização dos parâmetros de aplicação da VOQ para ECV	28
4.2.5.	Parâmetros Seleccionados para ECV	35
4.3.	Estudos empregando EPC e EPCM.....	36
4.3.1.	Estudo da melhor composição em porcentagem de modificador para EPCM.....	37
4.3.2.	Otimização dos parâmetros de aplicação da VOQ para EPC	38
4.3.3.	Parâmetros seleccionados para EPC e EPCM	39
4.4.	Estudos para a determinação da Danofloxacin em ECV	40
4.4.1.	Curva de calibração empregando ECV	40
4.4.2.	Determinação da danofloxacin em amostras de urina bovina com ECV	42
4.4.3.	Determinação da danofloxacin em amostras de urina suína com ECV	44
4.4.4.	Determinação analítica do Advocin® (2,5 %) por ECV.....	45
4.5.	Determinação analítica da Danofloxacin em EPC e EPCM.....	47
4.5.1.	Determinação da danofloxacin em urina bovina com EPC e EPCM.....	49
4.5.2.	Determinação da danofloxacin em urina suína com EPC e EPCM	52
4.6.	Determinação da danofloxacin por espectrofotometria de UV/VIS.....	55
4.5.1.	Determinação da danofloxacin em urina bovina	56
4.5.2.	Determinação da danofloxacin em urina suína	57
4.5.3.	Determinação do medicamento Advocin® 2,5%	58
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		60
CAPITULO 6 - REFERÊNCIAS.....		61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das quinolonas.....	1
Figura 2: molécula de norfloxacin com os substituintes –F e piperazilo nas posições 6 e 7 respectivamente.[5].....	2
Figura 3: Estrutura da fluoroquinolona danofloxacin.	3
Figura 4: sinal de excitação proveniente da técnica de voltametria cíclica (i), voltamograma cíclico esquemático para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv). Versão adaptada.....	6
Figura 5: Sequência de aplicação de pulsos de potencial na voltametria de onda quadrada. ...	8
Figura 6: a) Estrutura do ácido succínico; b) Estrutura do complexo succinato de ferro; estrutura do complexo de succinato de zinco.	11
Figura 7: Modo de preparo das pastas de carbono modificadas.	17
Figura 8: A: Voltamogramas cíclicos de Danofloxacin $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de eletrólito tampão BR (pH 5,00) com 100 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 danofloxacin $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 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 mol L^{-1}	20
Figura 9: Densidade de corrente de pico para a danofloxacin, juntamente com o desvio padrão entre as medidas das triplicatas para diferentes concentrações de metanol. Danofloxacin $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 5,0 sobre ECV (eletrodo de carbono vítreo) com ΔE_s : 10 mV; a : 10 mV; f : 10,0 Hz.	22
Figura 10: Estrutura da fluoroquinolona danofloxacin em pH 6,4.....	23
Figura 11: Variação do potencial de pico em função do pH para a danofloxacin ($6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Inserção: VOQ com a variação de pH em função da densidade de corrente, condições: $a = 10 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1}	24
Figura 12: Densidade de corrente de pico para a danofloxacin, juntamente com o desvio padrão ($n = 3$) para diferentes pH do tampão BR. Danofloxacin $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV (eletrodo de carbono vítreo) com ΔE_s : 0,01V; a : 0,01V; f : 10,0 Hz.	25

- Figura 13:** Voltamogramas de onda quadrada para diferentes surfactantes com concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. BR pH 5,0. Danofloxacina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$; $a = 10 \text{ mV}$ e $f = 10,0 \text{ Hz}$ 27
- Figura 14:** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a detecção da danofloxacina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, BR pH 5,0 registrados com diferentes frequências com $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e $a = 10 \text{ mV}$, Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} 29
- Figura 15:** Dependência da densidade de corrente de pico (j_p) em função da frequência no eletrólito de suporte para a detecção da DANO em tampão BR pH 5,0. Inserção: VOQ registrados para diferentes frequências, com $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e $a = 10 \text{ mV}$ 30
- Figura 16:** Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência da onda quadrada. 31
- Figura 17:** VOQ obtidos para a detecção de danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. BR pH 5,0 registrados com diferentes incrementos de potencial. $f = 20 \text{ Hz}$ e $a = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1} 32
- Figura 18:** Dependência da densidade de corrente de pico j_p em função da altura de degrau no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) registrados com diferentes alturas de degrau. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $a = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 M. 33
- Figura 19:** Dependência da densidade de corrente de pico j_p em função da amplitude no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacina em BR pH 5,0, registrados com diferentes amplitudes. Inserção: VOQ registrados para diferentes amplitudes, com $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1} 34
- Figura 20:** Dependência da corrente de pico j_p em função do tempo de equilíbrio no eletrólito suporte BR para a detecção de danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) registrados com diferentes tempos de equilíbrio. Condições $a = 20 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ 35
- Figura 21:** Voltamograma de onda quadrada obtidos para a detecção da danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) com as melhores condições encontradas. Condições: 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 M. 36

Figura 22: VOQ para detecção da danofloxacina em eletrodos com distintas porcentagens dos modificadores de EPC. Condições: 2,5% de metanol, 4×10^{-6} mol L ⁻¹ de surfactante lauril sulfato de sódio, $t_{eq} = 10$ s, $a = 20$ mV, $f = 20$ Hz e $\Delta E = 8$ mV.	37
Figura 23: Dependência da corrente de pico I_p em função da amplitude no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacina em BR pH 5,0, registrados com diferentes amplitudes. Inserção: VOQ com EPC, registrados para diferentes amplitudes, com $f = 20$ Hz e $\Delta E_s = 8$ mV, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.	39
Figura 24: Curva de calibração para danofloxacina em BR pH 5,0 com concentrações variando de $9,95 \times 10^{-6}$ a $4,41 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , $f = 20$ Hz, $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 8$ mV e $t_{eq} = 10$ s. Inserção: VOQ em diferentes concentrações.	41
Figura 25: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em urina bovina ($n = 3$). Inserção: VOQ obtidos para as concentrações de $4,77 \times 10^{-6}$ a $14,2 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ do padrão em BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 20$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.	43
Figura 26: Relação entre corrente de pico e concentração de danofloxacina 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 ⁻¹ do padrão em BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 20$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.	44
Figura 27: Curva de adição de padrão para determinação de DANO no fármaco Advocin® em ECV. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.	46
Figura 28: Curvas analíticas para danofloxacina em A para EPC; B = EPCM-HSuc; C = EPCM-ZnSuc; D = EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com concentrações variando de $1,3 \times 10^{-7}$ a $1,3 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ , $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV, $\Delta E_s = 8$ mV e $t_{eq} = 10$ s. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.	47
Figura 29: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPC. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.	49
Figura 30: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-HSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.	50
Figura 31: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-ZnSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.	50

Figura 32: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.....	51
Figura 33: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPC. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.....	52
Figura 34: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-HSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.....	53
Figura 35: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-ZnSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. ...	53
Figura 36: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.....	54
Figura 37: Curva de calibração obtida pelo aumento do pico de absorção da danofloxacina em $\lambda = 279$ nm.	55
Figura 38: Curva de adição de padrão construída pra determinação da danofloxacina em meio de urina bovina, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/VIS.	56
Figura 39: Curva de adição de padrão construída pra determinação da danofloxacina em meio de urina suína, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/Vis.....	57
Figura 40: Curva de adição de padrão construída pra determinação da danofloxacina no fármaco Advocin 2,5%, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/VIS.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedência dos reagentes utilizados.	14
Tabela 2: Porcentagens em massa (% m/m) do modificador analisadas na detecção da danofloxacin.....	17
Tabela 3: Distintos modificadores presentes no EPC e respectivas denominações.	18
Tabela 4: Média das triplicatas, desvio padrão para as diferentes porcentagens de metanol. .	22
Tabela 6: Estrutura dos surfactantes utilizados para melhorar a detecção da fluoroquinolona danofloxacin.....	26
Tabela 7: Valores de média para potencial de pico e desvio padrão (n = 3) para densidade de corrente de pico, para uma solução de Danofloxacin $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com o uso de diferentes concentrações do surfactante.	28
Tabela 8: Parâmetros selecionados para a análise de Danofloxacin através da metodologia eletroanalítica utilizando eletrodo de carbono vítreo sob a técnica de VOQ.	35
Tabela 9: Parâmetros selecionados para a análise de Danofloxacin por VOQ utilizando EPC e EPCM.	39
Tabela 10: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas obtidos na determinação de danofloxacin empregando VOQ.	42
Tabela 11: Resultados de recuperação para Danofloxacin em amostra de urina bovina obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.	43
Tabela 12: Resultados de recuperação para danofloxacin em amostra de urina suína obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.	45
Tabela 13: Resultados de recuperação para o fármaco Advocin® obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.	46
Tabela 14: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas obtidos na determinação de danofloxacin empregando VOQ em EPCM.	48
Tabela 15: Resultados de recuperação para Danofloxacin em amostra de urina bovina obtidos por voltametria de onda quadrada sobre EPC e EPCM.	51
Tabela 16: Resultados de recuperação para Danofloxacin em amostra de urina suína obtidos por voltametria de onda quadrada sobre EPC e EPCM.	54
Tabela 17: Parâmetros obtidos da curva analítica obtida por espectrofotometria de UV/VIS na detecção da danofloxacin.	55

Tabela 18: Recuperação obtida para amostra de urina bovina fortificada com danofloxacin.56

Tabela 19: Recuperação obtida para amostra de urina suína fortificada com danofloxacin. 57

Tabela 20: Quantidade do fármaco encontrado pelo método de espectroscopia de UV/VIS. ..58

LISTA DE ABREVIÇÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

μ	<i>Micro (10^{-6})</i>
a	<i>Amplitude</i>
A	<i>Ampere</i>
CE	<i>Contra eletrodo</i>
CLAE	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
DANO	<i>Danofloxacina</i>
ECS	<i>Eletrodo de Calomelano Saturado</i>
ECV	<i>Eletrodo de Carbono Vítreo</i>
EPC	<i>Eletrodo de Pasta de Carbono</i>
EPCM	<i>Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado</i>
EPCM-FeSuc	<i>Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado – succinato de ferro</i>
EPCM-HSuc	<i>Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado – ácido succínio</i>
EPCM-ZnSuc	<i>Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado – succinato de zinco</i>
ER	<i>Eletrodo de referência</i>
ET	<i>Eletrodo de trabalho</i>
f	<i>Frequência</i>
FL	<i>Faixa de Linearidade</i>
I_p	<i>Corrente de pico</i>
j_p	<i>Densidade de corrente de pico</i>
LD	<i>Limite de Detecção</i>
LQ	<i>Limite de Quantificação</i>
nm	<i>Nanômetro</i>
t_{eq}	<i>Tempo de equilíbrio</i>
UV/VIS	<i>Ultravioleta/Visível</i>
V	<i>Volts</i>
VOQ	<i>Voltametria de Onda Quadrada</i>
ΔE_s	<i>Incremento de potencial</i>
λ	<i>Comprimento de onda</i>

RESUMO

O comportamento voltamétrico da danofloxacin em meio aquoso foi estudado em eletrodo de carbono vítreo utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Depois da otimização das condições experimentais adequou-se os parâmetros aos eletrodos de pasta de carbono (EPC) e eletrodo de pasta de carbono modificada (EPCM). A danofloxacin foi analisada em amostras de urina bovina e suína fortificadas com o antibiótico e determinada pelo método de adição de padrão. Os EPC e EPCM apresentaram melhora na sensibilidade com relação ao eletrodo de carbono vítreo (ECV), os LDs obtidos utilizando EPC/EPCM foram cerca de 30 vezes menores quando comparado ao LD utilizando o ECV. As melhores recuperações de danofloxacin em amostra de urina bovina foram para EPCM-ZnSuc e EPCM-FeSuc de 86 % e 88,57 % respectivamente. Para amostra de urina suína foram obtidas recuperações de 101,59 % e 110,68 % para EPCM-Znsuc e EPCM-FeSuc respectivamente.

Palavras-chave: voltametria de onda quadrada, danofloxacin, eletrodo de pasta de carbono modificado.

ABSTRACT

The voltammetric behavior of danofloxacin in aqueous solution has been studied on a glassy carbon electrode using square wave voltammetry (SWV). After optimization of the experimental conditions, adapted to the parameters for the carbon paste electrode (CPE) and modified carbon paste electrode (MCPE). The danofloxacin was analyzed in spiked samples of bovine and swine urine using a Britton-Robinson buffer with $\text{pH} = 5.0$ as the supporting electrolyte. The danofloxacin was analyzed in samples of bovine and swine urine spiked with antibiotic were determined by standard addition method. CPE and MCPE showed improved sensitivity to a glassy carbon electrode (GCE), LODs obtained using CPE/MCPE were about 30 times smaller when compared to LOD using the GCE. The best recoveries danofloxacin in bovine urine sample were for MCPE-ZnSuc and MCPE-FeSuc of 86 % and 88,57% respectively. For swine urine sample recoveries of 101.59% and 110.68% were obtained for MCPE-ZnSuc and MCPE-FeSuc respectively.

Keywords: square wave voltammetry, danofloxacin, modified carbon paste electrode.

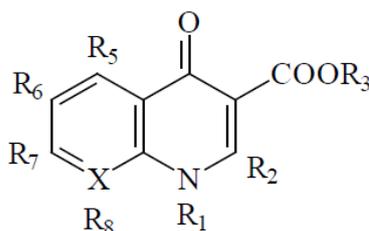
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. Fluoroquinolonas

As quinolonas (Figura 1) surgiram como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de atividade antibacteriana conhecida e comprovada. Segundo Silva e Hollenbach [1], a substância foi descoberta no ano de 1962 por George Leshner e colaboradores¹ em uma destilação, durante a síntese de cloroquina, este produto secundário revelou possuir também atividade antimicrobiana, surgindo assim a primeira quinolona: o Ácido Nalidíxico.

O ácido nalidíxico composto com atividade contra bactérias gram-negativas foi então introduzido no combate às doenças urinárias não complicadas, sendo então denominada de quinolona de primeira geração[1,2].

Figura 1: Estrutura química das quinolonas.

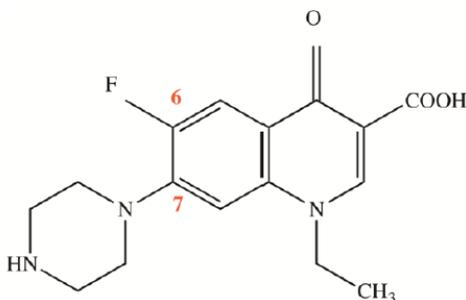


Buscando melhorar a atividade contra anaeróbios, bactérias Gram-positivas e inclusive *Pseudomonas* spp., por volta das décadas de 70 e 80, foram realizados intensos estudos a partir das primeiras quinolonas, o que originaram nas chamadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas[3].

As quinolonas de segunda geração tem uma substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor na posição 6 e a introdução de um grupo peperazinil na posição 7 (Figura 2). Estas modificações provocavam um melhoramento na atividade antibacteriana como a eficiência contra a *Pseudomonas aeruginosa* e *Coccus* Gram-positivas. O aumento na eficácia desses compostos foi devido a melhoria na absorção por via oral e melhor distribuição pelos tecidos como é relatado por Martinez [4].

¹ Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, p. 1063-1068, 1962.

Figura 2: molécula de norfloxacin com os substituintes –F e piperazilo nas posições 6 e 7 respectivamente.[5]



As fluoroquinolonas que representam esse grupo são principalmente a enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, lomefloxacina e a perfloxacina, esses compostos apresentam atividade antibacteriana cerca de mil vezes superior que a observada em seu antecessor o ácido nalidixico [1].

A terceira geração de quinolonas possui maior atividade contra bactérias Gram positivas, microorganismos anaerobios e outras estirpes resistentes comparado com as quinolonas das gerações anteriores, sendo as principais quinolonas dessa classe a levofloxacina e sparfloxacina [4].

Uma maior atividade contra bactérias anaeróbias permitiu distinguir parte destes novos compostos numa quarta geração de quinolonas (moxifloxacina, trovafloxacina). As maiorias das quinolonas da geração anterior não apresentavam substituintes –F na posição 6, na quarta geração retomou-se o desenvolvimento de novas fluoroquinolonas. As modificações estruturais permitiram obter agentes antimicrobianos com maior espectro de ação estendendo-se este a microorganismos anaeróbios como descrito por Bambeke [6].

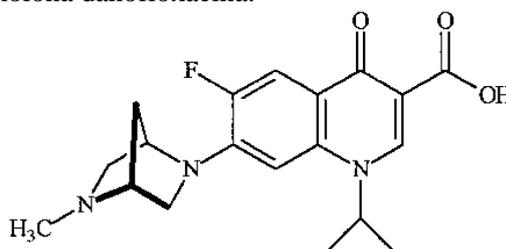
Ainda para Bambeke [6] as fluoroquinolonas são os únicos agentes antibacterianos a competir com os antibióticos b-lactâmicos (amoxicilina, cefalosporinas) em nível de impacto na utilização clínica no campo antibacteriano. Existe um enorme número de novas fluoroquinolonas, e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antibióticos se desenvolvesse rapidamente, desde os primeiros compostos sintetizados (com aplicação limitada) até aos novos compostos, cujo maior espectro de ação e farmacocinética permitisse uma única dosagem diária.

De acordo com Bakken e Bambeke *et al.* [6,7] as fluoroquinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano por se ligarem às enzimas topoisomerases II e IV. De um modo geral, as

fluoroquinolonas ligam-se à topoisomerase II nas espécies Gram negativa e à topoisomerase IV nas espécies Gram positiva. A topoisomerase II (ou DNA girase) foi a enzima alvo das primeiras quinolonas, como é o caso do ácido nalidíxico. A topoisomerase IV foi descoberta como alvo destes fármacos quando as primeiras resistências às quinolonas de primeira geração começaram a aparecer em *Staphylococcus aureus* [8]. As fluoroquinolonas formam um complexo ternário [fármaco-enzima-DNA] com as topoisomerases IV, inibindo a replicação do DNA [6,7].

As quinolonas vieram ao mercado, para tratamento de humanos e em animais. A fluoroquinolona de trabalho Danofloxacina (Figura 3) foi lançada no mercado para uso exclusivo em terapêutica veterinária como relata Mestorino *et al.* [9]. Sendo um antimicrobiano sintético, altamente solúvel em água, com potente atividade *in vitro* contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, patógenos de bovinos e suínos [10].

Figura 3: Estrutura da fluoroquinolona danofloxacina.



A Danofloxacina é um agente antimicrobiano de segunda geração de quinolonas [11] desenvolvida para utilização em medicina veterinária como um sal mesilato para o tratamento de doenças respiratórias em bovinos, suínos e frangos. A danofloxacina apresenta um amplo espectro de atividade contra a maioria das bactérias Gram negativa e Gram positiva e *Mycoplasma*, mas tem baixa atividade contra anaeróbios [9]. Para bovinos, o seu uso foi introduzido no o tratamento da pleuropneumonia contagiosa causada pela bactéria *Mycoplasma mycoides*, os autores relataram alguns efeitos benéficos após utilização da fluoroquinolona danofloxacina, incluindo a redução da mortalidade. [12]

É importante desenvolver metodologias analíticas para determinação de fármacos, sobretudo do antibiótico danofloxacina em urina, tal necessidade é aplicada pela alta dosagem eliminada na urina bovina e suína na forma inalterada, respectivamente 38 e 43% [13]. Os fármacos foram desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas, para servir a um proposito terapeutico. No entanto, alta dosagem do fármaco é excretada na

forma inalterada e persiste no meio ambiente. O uso desenfreado de antibióticos acarreta dois problemas ambientais: um, é a contaminação dos recursos hídricos e outro, é que alguns microorganismos criam resistência a esses fármacos, e analisar os rejeitos é uma forma de encontrar concentrações maiores que em corpos d'água. [14].

Na literatura existem poucos procedimentos analíticos desenvolvidos para determinação da danofloxacin [15]. Sendo, a maioria desses trabalhos envolvendo a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Rodríguez Cáceres *et al.* [16] desenvolveram método CLAE com detecção eletroquímica que permitia a determinação simultânea de três fluoroquinolonas nomeadamente danofloxacin, difloxacin e sarafloxacin. Estas fluoroquinolonas são separadas em uma coluna de C-18 e detectadas numa célula amperométrica de alta sensibilidade. Outro trabalho separa onze quinolonas introduzidas na alimentação animal, utilizaram CLAE com detector de fluorescência e absorção ultravioleta [17]. Van Hoff e colaboradores [18] estudaram a determinação simultânea de 8 quinolonas utilizando CLAE com detecção de espectrometria de massas em músculos e leite de origem bovina.

No desenvolvimento de técnicas adequadas à quantificação de analitos, a velocidade analítica e o custo da análise são aspectos particularmente importantes. 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 apropriados[19].

Na literatura relatam a determinação de algumas fluoroquinolonas utilizando esta técnica voltamétrica, alguns deles são: moxifloxacin [20], norfloxacin [21], perfloxacin [22], levofloxacin [23], ofloxacin [24], enrofloxacin [25].

Para a danofloxacin encontrou-se apenas dois trabalhos envolvendo estudos voltamétricos, sendo que um deles foi realizado a determinação eletroquímica do fármaco por voltametria de pulso diferencial utilizando eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de pasta de carbono [15]. Outro trabalho encontrado foi o desenvolvimento de estudos voltamétricos para determinação analítica dos antibacterianos danofloxacin e orbifloxacin utilizando voltametria cíclica e de pulso diferencial catódica adsortiva em urina humana e soro [26].

1.2. Métodos eletroanalíticos

Dentre as técnicas analíticas existentes, os métodos eletroanalíticos compreendem um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de soluções contendo o analito.

Uma das mais importantes características da eletroanalítica relaciona-se com o fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica tais como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesse nas diferentes áreas de estudo [27]. As técnicas eletroanalíticas comumente permitem análise direta da amostra ou mesmo quando necessitam de um pré-tratamento, estes são mais rápidos e simples do que aqueles usados nas técnicas cromatográficas [28].

A crescente importância da química eletroanalítica levou ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis às espécies em estudo, algumas inclusive com baixos limites de detecção comparáveis aos das técnicas tradicionais utilizadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos [27].

Eletroquímica fornece técnicas analíticas caracterizadas pela simplicidade instrumental, custo moderado e portabilidade. Técnicas eletroanalíticas podem ser facilmente adotadas, para resolver problemas de interesse farmacêutico com um alto grau de exatidão, precisão, sensibilidade e seletividade, muitas vezes de forma reprodutível. Os primeiros exemplos da análise farmacêutica usando por métodos polarográficos foram descritos na década de 1930 e 1940. A maioria dos compostos farmacêuticos ativos foi considerada como eletroquimicamente ativo. As técnicas voltamétricas foram extremamente úteis para medir os níveis sanguíneos, metabolitos e excreção urinária de drogas após administração de doses baixas, especialmente quando conjugada com métodos cromatográficos. Em muitos casos, as técnicas eletroanalíticas modernas como voltametria de onda quadrada (VOQ) pode ser usada como uma alternativa disponível para se usar, ao invés da espectrometria mais frequentemente usado ou métodos de separação [29].

As técnicas eletroanalíticas, principalmente aquelas em que a varredura de potenciais gera sinais analíticos na forma de correntes, têm sido empregadas na determinação de diversos analitos. Dentre as várias técnicas, algumas se destacam por apresentar grande sensibilidade e reprodutibilidade dos sinais analíticos. Como exemplos, tem-se a voltametria

de redissolução anódica e catódica, por pulso diferencial e por voltametria de onda quadrada (VOQ) esta última vem ganhando a atenção da comunidade científica devido a sua versatilidade na detectabilidade de diversas das espécies eletroativas [30].

Devido a esse fato que o trabalho volta-se a encontrar condições que melhorem a sensibilidade frente a medicamentos e minimizando os efeitos de matriz, que é uma grande vantagem das técnicas eletroanalíticas.

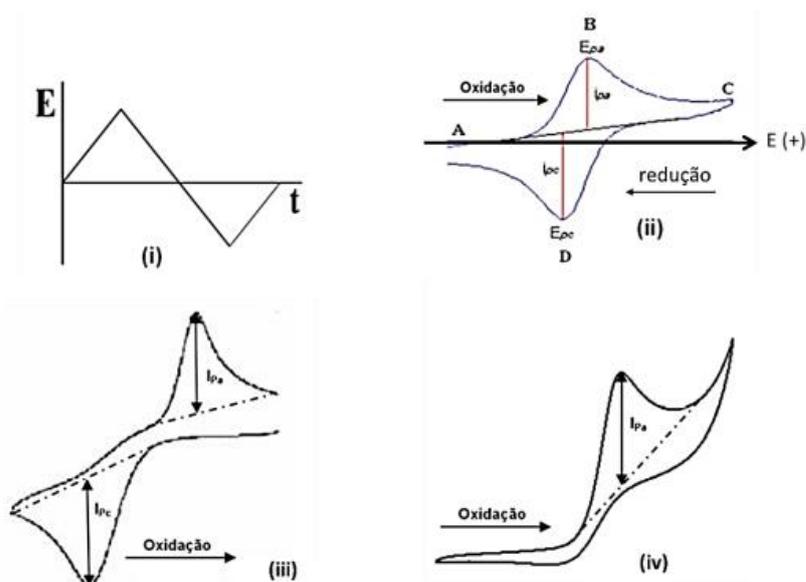
1.2.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Nesta técnica realiza-se a varredura de potencial direta e inversa em vários ciclos sucessivos observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos [31].

Nessa técnica, o potencial aplicado ao eletrodo varia numa velocidade fixa, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é invertida. Para processos reversíveis, a essa perturbação, um par de picos, catódico e anódico, possibilita identificar os seguintes parâmetros eletroquímicos necessários à caracterização do processo eletródico ocorrido: potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$). A ilustração do sinal de excitação e os voltamogramas cíclicos registrados, caracterizando a reversibilidade dos processos eletroquímicos, encontram-se na Figura 4. Para um sistema irreversível, nenhum pico reverso aparece ao se inverter a direção da varredura [31].

Figura 4: sinal de excitação proveniente da técnica de voltametria cíclica (i), voltamograma cíclico esquemático para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv). Versão adaptada².

² BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A., *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*. New York: Oxford University Press Inc., 1996, 471p.



Neste trabalho a voltametria cíclica foi utilizada apenas para o estudo inicial, no que diz respeito à reversibilidade do analito.

1.2.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os 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 eletrodico em estudo.

A VOQ é uma técnica em que a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, onde pulsos de potencial (ΔE_p) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_s) e duração $2t_p$ (período). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto e reverso, originando um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado (ΔI), que é um sinal obtido diferencialmente, e apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas [31].

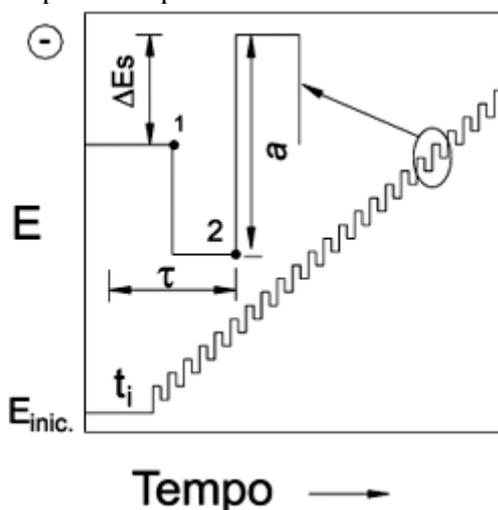
Nesta técnica, o regime de amostragem permite obter como resposta três tipos de curvas: a corrente I_1 (ou I_d) registrada no final do pulso de potencial direto (corrente direta), a corrente I_2 (ou I_r) registrada no final do pulso reverso (corrente reversa) e a corrente total ou

resultante (ΔI ou I_t) que corresponde à diferença entre essas duas. A corrente I_2 possui sinal contrário a I_1 [27].

O tempo τ durante o qual o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de pulso, e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s e a velocidade de varredura $v = \tau \Delta E_s$ [31]. As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado. A

Figura 5 apresenta a forma de aplicação do potencial da VOQ [32].

Figura 5: Sequência de aplicação de pulsos de potencial na voltametria de onda quadrada.



A VOQ é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os 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 eletrodico em estudo [27].

1.3. Importância do uso do surfactante

Os surfactantes têm sido amplamente utilizados em química e, nomeadamente afetando vários processos eletroquímicos. As principais aplicações de surfactantes em eletroquímica são em galvanoplastia, corrosão, células de combustível, eletrocatalise, e

eletroanálise. Os surfactantes são eficazes na eletroanálise dos compostos biológicos e drogas quando adicionados no eletrólito suporte [33].

Recentemente, foi mostrado que os surfactantes são altamente eficazes na estabilização da resposta voltamétrica de serotonina, evitando adsorção na superfície do eletrodo [33]. Em outro estudo, mostrou-se que os tensoativos aniônicos podem também ser utilizado para melhorar a acumulação eletroativa orgânica de algumas moléculas, em eletrodos de ouro. Recentemente a influência de micelas na determinação simultânea de dois componentes também foi demonstrada, por detecção simultânea de ácido ascórbico e da dopamina e também do catecol e hidroquinona [34].

Superfície do eletrodo com caráter hidrofóbico, tais como eletrodos de pasta de carbono interagem com surfactantes, ou seja, através da superfície de adsorção. Assim, eletrodo de pasta de carbono modificado com surfactantes provou ser útil para a determinação de ambas as espécies inorgânicas, e compostos biológicos [33].

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar). A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) [35].

Os tensoativos são frequentemente empregados para modificar o meio reacional permitindo solubilizar espécies de baixa solubilidade ou promover um novo meio que pode modificar a velocidade reacional, o estado de equilíbrio das reações químicas e em alguns casos a estereoquímica destas dependendo da natureza da reação, do tipo de reativo (eletrofílico, nucleofílico, etc) e do tipo e forma (catiônica, aniônica, etc) da micela. Pode-se destacar o emprego de ambientes micelares principalmente sob dois aspectos. O primeiro se refere à exploração das características do ambiente micelar, formado no meio reacional para a melhoria da sensibilidade e/ou seletividade, e o segundo, se relaciona a etapas de concentração e/ou separação, empregando tensoativos em substituição às metodologias tradicionais (extração líquido-líquido, troca iônica) [36].

A adsorção de surfactante na superfície do eletrodo de trabalho e a formação de agregados micelares pode alterar de modo significativo os valores de potencial e de corrente de pico de oxidação e/ou redução das espécies eletroativas, coeficientes de transferência

eletrônica e de difusão, contribuindo para uma melhor sensibilidade das espécies eletroativas [37].

Para Wang e colaboradores um mecanismo de melhora ocorre quando surfactantes adsorvidos eletrostaticamente em analitos na superfície do eletrodo. Por exemplo, quando o carregado positivamente tensoativo (brometo de cetil trimetil amônio) foi adsorvido em um eletrodo de carbono vítreo, a concentração de dinitrofenóis carregada negativamente sobre o eletrodo foi aumentada via atração eletrostática e as correntes de pico de redução foram aprimoradas, aumentando a sensibilidade de detecção [38].

Os surfactantes podem melhorar o desempenho no fluxo elétrico, levando a separações mais eficientes. O uso de surfactantes é vantajoso pelo fato de que existem inúmeros surfactantes, com diferentes estruturas que se adapta a vários tampões do eletrólito de suporte, sendo assim de fácil utilização e conseguem-se bons resultados em uma análise eletroquímica.

1.4. Eletrodos Modificados de Pasta de carbono

O desenvolvimento e aplicação de eletrodos modificados tem tido crescente interesse nas áreas de ciências e tecnologia, com aplicação em diversos campos de pesquisa, tais como electrocatálise, síntese electroorgânica, conversão de energia solar e, principalmente, em electroanálise e sensores químicos. A denominação de eletrodos quimicamente modificados foi sugerida por Murray³ na década de 70 para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas devidamente imobilizadas na superfície desses dispositivos. A modificação do eletrodo normalmente confere a este as características físico-químicas (reatividade, seletividade etc.) do modificador, possibilitando assim o desenvolvimento de dispositivos com resposta adequada para vários propósitos e aplicações [39].

O primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi desenvolvido por Adams com o objetivo de atingir potenciais mais positivos, o que não podia ser alcançado com o eletrodo gotejante de mercúrio devido à sua oxidação. Os trabalhos iniciais de Adams visaram caracterizar os EPC empregando técnicas electroquímicas básicas [40]

No final da década de 70 surgiram vários trabalhos empregando modificações dos eletrodos, sendo o início dos anos 80 um marco na história dos eletrodos de pasta de carbono

³ Murray, R. W. Chemically modified electrodes: VI. Binding and reversible electrochemistry of tetra-(aminophenyl)porphyrin on glassy carbon. **Journal of electroanalytical chemistry**. v. 78, p. 395, 1977.

modificados, quando se desenvolveu um sensor modificado com dimetilglioxima para a determinação de íons Ni(II) [39].

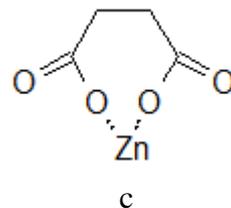
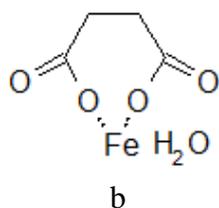
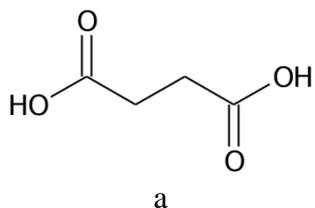
Nos últimos anos, os eletrodos de pasta de carbono modificados têm atraído interesse devido às suas aplicações potenciais em diversas análises. Modificações da matriz de pasta com vários complexos de metais de transição e nanotubos de carbono foram relatadas nos últimos anos. Estes eletrodos têm sido utilizados em eletroanálise devido à sua capacidade de catalisar o processo redox de algumas moléculas de interesse, uma vez que facilitam a transferência de elétrons. Esses tipos de eletrodos são baratos e possuem muitas vantagens, tais como baixa corrente de fundo, ampla janela de potencial (em ambas as regiões catódica e anódica), fácil fabricação e renovação de superfície [41,42].

Os eletrodos de pasta de carbono (EPCs) devem apresentar baixa solubilidade no meio de trabalho, alta pureza química dos reagentes empregados na preparação da pasta, baixa adsorção de impurezas eletroativas e apresentar uma distribuição granulométrica uniforme. A otimização dos processos de preparação destas pastas é extremamente importante para que não haja dificuldade de obtenção de uma pasta consistente com propriedades condutoras e incorporação das espécies em estudo, pois esses fatores estão relacionados com a estabilidade e reprodutibilidade da pasta confeccionada [43].

Nos eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM) são incorporados modificadores de substâncias que promovem melhoria de sensibilidade e/ou seletividade de compósitos. Os compósitos geralmente possuem características condutoras. A construção desses eletrodos é geralmente feita pela mistura de pó grafite, um aglutinante não condutor e um modificador.

O ácido succínico (figura 6a) é um metabolito comum formado pelas plantas, animais e microrganismos [44] tendo ampla aplicação como polímeros biodegradáveis, tintas, detergentes, reguladores de crescimento de plantas e aditivos alimentares. No mercado de alimentos é produzido unicamente por processo fermentativo [45].

Figura 6: a) Estrutura do ácido succínico; b) Estrutura do complexo succinato de ferro; estrutura do complexo de succinato de zinco.



Não há relatos na literatura do uso do ácido succínico como modificador em eletrodos de pasta de carbono, no entanto, este vem sendo aplicado como inibidor da corrosão de aço [46].

Os complexos succinatos dos metais de transição Fe e Zn foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa da universidade UNESP [47], este trabalho buscou avaliar as potencialidades do ácido succinico e dos complexos succinatos como modificadores em eletrodos de pasta de carbono.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é propor um novo método analítico para determinação de danofloxacin em urina (bovina e suína) empregando ECV e EPC/EPCM com detecção por voltametria de onda quadrada.

2.2. Objetivo Específico

De acordo com o objetivo geral, seguem abaixo os objetivos específicos:

- a) Otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico para a determinação da Danofloxacin;
- b) Construção de curvas analíticas e cálculos de figuras de mérito as metodologias analíticas;
- c) Aplicação da metodologia desenvolvida obtida em amostras de urina bovina e suína, bem como na formulação farmacéutica do Advocin®.

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes, soluções e preparo dos EPC/EPCM

3.1.1. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados apresentam pureza analítica (P.A.). Na tabela abaixo, são apresentadas as procedências de todos os reagentes utilizados.

Tabela 1: Procedência dos reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula química	Procedência
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	Vetec
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Dinâmica
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Dinâmica
Álcool metílico	CH ₃ OH	Impex
Cloreto de potássio	KCl	Quimis
Danofloxacina	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	Merck

A água empregada para preparação das soluções e lavagem das vidrarias foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Inc.), apresentando resistividade 18,2 MW cm.

3.1.2. Soluções

3.1.2.1. Soluções tampão

O eletrólito de suporte empregado foi o tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹, preparadas a partir de ácido acético 0,04 mol L⁻¹, ácido bórico 0,04 mol L⁻¹ e ácido fosfórico 0,04 mol L⁻¹. Para o ajuste até o pH de interesse foi adicionado uma solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹.

3.1.2.2. Solução estoque de Danofloxacina

A solução estoque de danofloxacina foi preparada pesando-se uma quantidade adequada do composto solubilizando-o em 50% de água deionizada e 50% metanol, para uma solução de 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹. A solução foi mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração em torno de 5 °C. A partir da solução estoque foi preparada uma solução de concentração 2,5 x 10⁻³ mol L⁻¹.

3.1.2.3. Solução estoque da danofloxacin em urina bovina

Para a determinação da danofloxacin em amostra de urina bovina, foi preparada uma solução de $75,05 \text{ mg L}^{-1}$, pois seria essa a quantidade aproximada do fármaco excretado na urina após 24 h da administração do medicamento, cerca de 38 % da dosagem é eliminada na urina [13]. Os cálculos foram feitos considerando uma dosagem de 2 mg do fármaco por cada quilograma de peso animal, e a quantidade excretada em uma média diária de urina de 10 litros de acordo com Weiss [48].

A solução estoque de urina bovina foi preparada adicionando-se 530 μL da solução estoque de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em balão volumétrico de 25 mL diluindo-se em urina bovina, obtendo uma concentração de $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a 75 mg L^{-1}). Adicionou-se uma alíquota dessa solução a célula eletroquímica, para que a concentração final seja próxima ao limite de detecção obtida para cada ECV e EPC/EPCM.

3.1.2.4. Solução estoque da danofloxacin em urina suína

Para a determinação da danofloxacin em amostra de urina suína, foi preparada uma solução de $62,54 \text{ mg L}^{-1}$, pois seria essa a quantidade aproximada do fármaco excretado na urina após 24 h da administração do medicamento, cerca de 43 % da dosagem é eliminada na urina [13]. Os cálculos foram feitos considerando uma dosagem de 2 mg do fármaco por cada quilograma de peso animal, e a quantidade excretada em uma média diária de urina de 3 litros [49].

A solução estoque de urina suína foi preparada adicionando-se 440 μL da solução estoque de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em balão volumétrico de 25 mL diluindo-se em urina suína, obtendo uma concentração de $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a 63 mg L^{-1}). Adicionou-se uma alíquota dessa solução a célula eletroquímica, para que a concentração final seja próxima ao limite de detecção obtida para cada ECV e EPC/EPCM.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Equipamentos

Para os experimentos eletroquímicos empregando o ECV foram realizados utilizando bipotenciostato/galvanostato portátil μ STAT 400 (DropSens) controlado por um computador, usando o software DropView. Para os experimentos utilizando EPC e EPCM, utilizou-se o potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB III/FRA 2 (Metrohm), acoplado a um computador com o software NOVA 1.10.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Bioprecisa, modelo FA2104N com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro modelo pHB500 (Ion®) e um eletrodo de vidro combinado universal da Eltex®.

Para remover as impurezas contidas na urina, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 3000 rpm em centrífuga (Excelsa). As soluções foram preparadas pela dissolução de danofloxacina e levadas a um ultrassom ultraCleaner 500 (Unique®) por 15 minutos.

Para garantir a homogeneidade na célula eletroquímica, entre as medidas eletroquímicas agitou-se a solução com o agitador magnético Fisaton modelo 751.

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.

3.1.1. Célula eletroquímica e eletrodos

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se uma célula eletroquímica convencional em vidro Pyrex com capacidade de até 20 mL, possuindo orifícios para a retirada de oxigênio da solução, posicionamento dos eletrodos e para adicionar as alíquotas da solução contendo Danofloxacina.

Em todos os experimentos voltamétricos foram utilizados eletrodos de referência de Ag/AgCl em KCl (sat.) ou eletrodo de calomelano saturado (ECS) e como eletrodo auxiliar foi utilizado fio aspirado de platina.

Foram utilizados como eletrodos de trabalho dois eletrodos de carbono vítreo, de área $0,1\text{ cm}^2$ e $0,17\text{ cm}^2$ respectivamente. Para a limpeza dos ECV, a cada varredura era feito o polimento da superfície do eletrodo em feltro com α -alumina ($0,05\ \mu\text{m}$) com movimentos circulares, por aproximadamente 15 segundos, após feito o polimento o eletrodo era lavado em água e assim retornando para a célula eletroquímica.

Os eletrodos de pasta de carbono utilizados foram os seguintes: eletrodo de pasta de carbono (EPC), eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido succínico (EPCM-HSuc), eletrodo de pasta de carbono modificado com succinato de ferro (EPCM-FeSuc) e eletrodo de pasta de carbono modificado com succinato de zinco (EPCM-ZnSuc). Os EPCM foram preparados pela mistura de pó grafite com tamanho de partícula de 20 μm (Aldrich), óleo mineral (Aldrich) e o modificador nas seguintes porcentagens apresentadas na tabela seguinte.

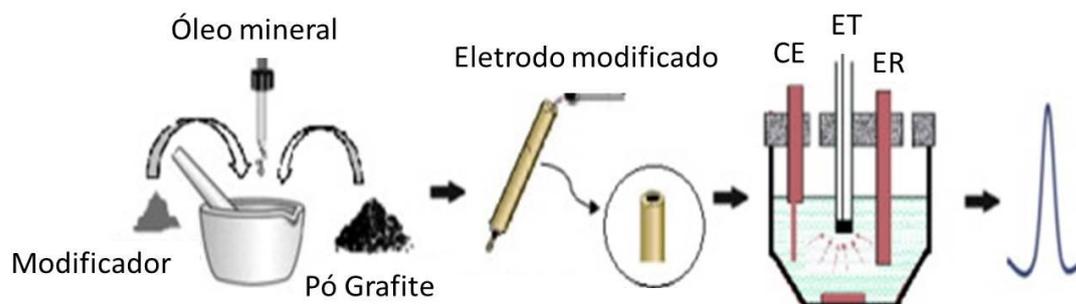
Tabela 2: Porcentagens em massa (% m/m) do modificador analisadas na detecção da danofloxacina.

Modificador	Pó grafite
0 %	70 %
1,5 %	68,5 %
3,0 %	67 %

Cada mistura foi homogeneizada em almofariz de ágata por aproximadamente 15 a 20 minutos para a preparação da pasta.

Os eletrodos foram confeccionados preenchendo seringas de 1,0 mL com as pastas introduzindo internamente uma haste de cobre para o contato elétrico externo, como é mostrado no esquema seguinte.

Figura 7: Modo de preparo das pastas de carbono modificadas⁴.



Foram feitas 4 pastas de carbono com modificadores diferentes, sendo elas apresentadas na Tabela 3 seguinte.

⁴ Fathirad, F.; Afzali, D. Mostafavi, A.; Samspur, T.; Fozooni, S. Fabrication of a new carbon paste electrode modified with -walled carbon nanotube for stripping voltammetric determination of bismuth(III). *Electrochimica Acta*. v. 103, p. 206-210. 2013.

Tabela 3: Distintos modificadores presentes no EPC e respectivas denominações.

Pastas de carbono confeccionadas	Modificador
EPC	Nenhum
EPCM-HSuc	Ácido succínio ($C_4H_6O_4$)
EPCM-FeSuc	Succinato de ferro ($FeC_2H_4C_2O_4 \cdot H_2O$)
EPCM-ZnSuc	Succinato de zinco ($ZnC_2H_4C_2O_4$)

O procedimento de limpeza e/ou renovação da superfície do EPC entre cada medida voltamétrica, foi feita friccionando o EPC em uma folha A4 limpa, sobre uma superfície horizontal e uniforme, de forma que o eletrodo tenha renovado totalmente sua área ativa. Este procedimento foi realizado a cada voltamograma que era obtido.

3.3. Metodologia

3.3.1. Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica foi empregada inicialmente para avaliar o comportamento eletroquímico e para escolha da melhor faixa de potencial de trabalho. A técnica de voltametria cíclica também foi empregada para obter informações sobre o mecanismo de oxidação e redução do composto em estudo.

Para a realização dos experimentos foram adicionados 5 mL do eletrólito de suporte (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) à célula eletroquímica e, em seguida, o oxigênio da solução foi removido pelo borbulhamento de nitrogênio por um período de 5 minutos.

3.3.2. Voltametria de onda quadrada

Esta técnica foi empregada para detecção de DANO em urina, primeiramente foram otimizadas os parâmetros voltamétricos, tais como frequência, amplitude e incremento de potencial, além disso, foi otimizado o pH do eletrólito de suporte, o tipo de surfactante e concentração do mesmo, além do estudo da % de metanol na célula eletroquímica.

3.3.3. Espectrofotometria de UV/Vis

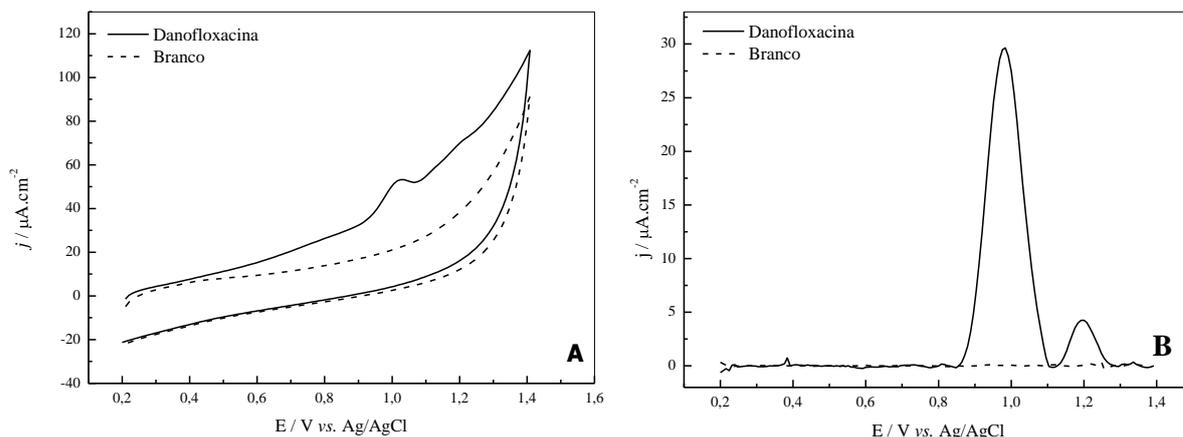
A técnica de espectrofotometria de UV/Vis foi utilizada como técnica comparativa, sendo construídas as curvas de adição de padrão avaliando a absorvância nesse comprimento de onda. Todas as soluções foram preparadas em 50:50 v/v água/metanol para ser utilizada no espectrofotômetro, sendo este o meio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

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento Eletroquímico

A técnica de voltametria cíclica foi empregada para avaliar a eletroatividade da danofloxacina sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A faixa de trabalho utilizada foi de 0,2 V a 1,4 V. A Figura 8A apresenta o voltamograma cíclico de DANO em tampão BR (pH 5,00) em ECV.

Figura 8: A: Voltamogramas cíclicos de Danofloxacina $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de eletrólito tampão BR (pH 5,00) com 100 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 $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$.



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 5-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 8-B um voltamograma de onda quadrada obtido com concentração aproximadamente 6 vezes menor.

Um passo importante para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica é a otimização dos parâmetros que possam influenciar na resposta voltamétrica. Para isto foi realizado um estudo da influência do pH do meio e dos parâmetros da VOQ, como frequência da onda quadrada (f), amplitude da onda quadrada (a) e incremento de potencial (ΔE), buscando, desta forma, o melhor sinal analítico.

4.2. Otimização dos parâmetros experimentais

Otimizar as condições experimentais é fundamental para a eletroanalítica, pois consegue-se uma melhor definição do pico de oxidação e/ou redução, esta resposta depende fundamentalmente do pH do eletrólito suporte, do uso de diferentes surfactantes e da porcentagem de metanol. Empregando VOQ os efeitos destas variáveis nas correntes de potenciais de pico da danofloxacin são apresentados nos itens a seguir (4.2.1 – 4.2.4).

4.2.1. Estudo da porcentagem de metanol

O primeiro parâmetro a ser estudado foi a porcentagem de metanol presente no eletrólito suporte. As densidades de corrente e potencial de pico em diferentes porcentagens de metanol e os respectivos desvios padrão entre as triplicatas das varreduras são apresentadas na Tabela 4.

Figura 9: Densidade de corrente de pico para a danofloxacina, juntamente com o desvio padrão entre as medidas das triplicatas para diferentes concentrações de metanol. Danofloxacina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 5,0 sobre ECV (eletrodo de carbono vítreo) com ΔE_s : 10 mV; a : 10 mV; f : 10,0 Hz.

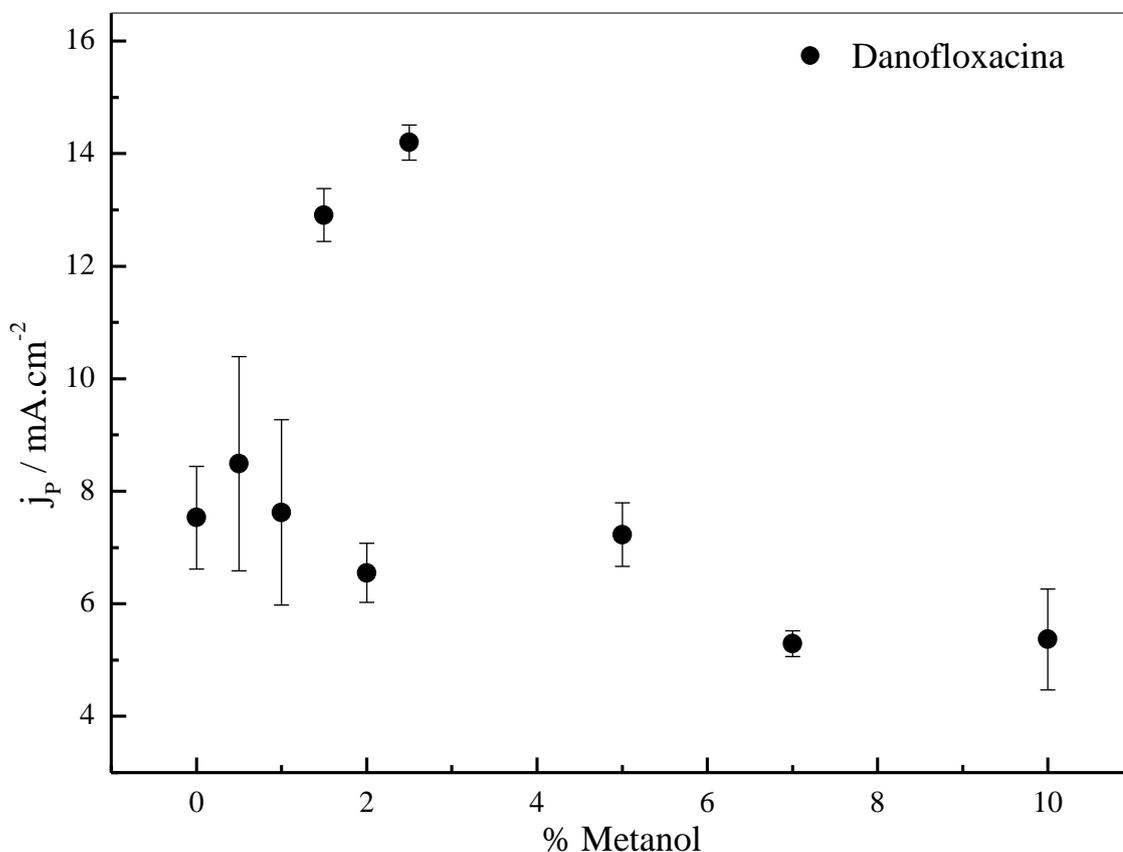


Tabela 4: Média das triplicatas, desvio padrão para as diferentes porcentagens de metanol.

<i>% MeOH</i>	E_p (média) / V	j_p (média) / $\mu\text{A.cm}^{-2}$	$SD j_p$
0,0	0,91	7,53	0,91
0,5	0,93	8,49	1,90
1,0	0,93	7,62	1,64
1,5	0,93	12,90	0,47
2,0	0,92	6,55	0,52
2,5	0,94	14,20	0,31
5,0	0,93	7,23	0,56
7,0	0,93	5,29	0,22
10,0	0,93	5,36	0,89

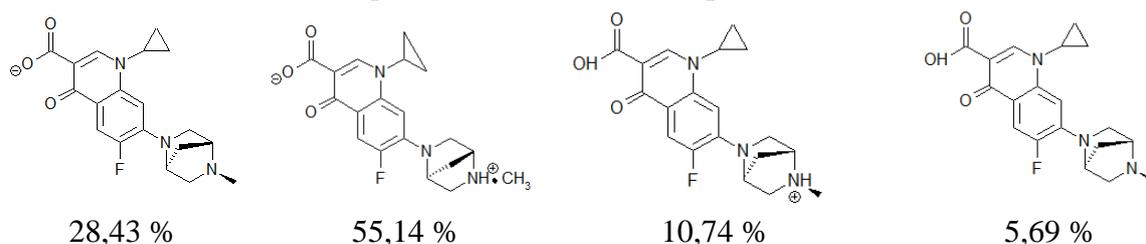
A partir dos dados apresentados na Figura 6 e Tabela 4, constatou-se que a melhor porcentagem de metanol a ser adicionada na célula eletroquímica é de 2,5 %, pois apresentou um maior valor de densidade de corrente de pico, o que aumenta a sensibilidade da técnica. A melhora da sensibilidade com o uso do metanol deve-se provavelmente ao fato de que

melhora a solubilidade da danofloxacin no eletrólito suporte, sendo que a melhor proporção escolhida de 2,5%(v/v) na célula eletroquímica, em percentuais maiores que 2,5% nota-se que há um decréscimo da densidade de corrente de pico, isso se deve provavelmente ao fato da diminuição da solubilidade da danofloxacin em grande quantidade de metanol formando precipitado, diminuindo assim o número de moléculas disponíveis para detecção eletroquímica..

4.2.2. Estudo do efeito do pH eletrólito suporte

Na inserção da Figura 11 são apresentados os VOQs para distintos pHs eletrólito suporte. Como é possível verificar, o aumento do pH do eletrólito suporte proporcionou o deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos e também uma diminuição na densidade de corrente de pico. Na Figura 11 observa-se a variação do E_p em função do pH, nos quais foram obtidas duas retas cuja intersecção em pH 6,4 corresponde ao pK_a da danofloxacin determinado experimentalmente, nesse pK_a aproximadamente 55,14% das moléculas de danofloxacin estão na seguinte forma apresentada na Figura 10. O pK_a da literatura é de 6,04⁵.

Figura 10: Estrutura da fluoroquinolona danofloxacin em pH 6,4⁶.

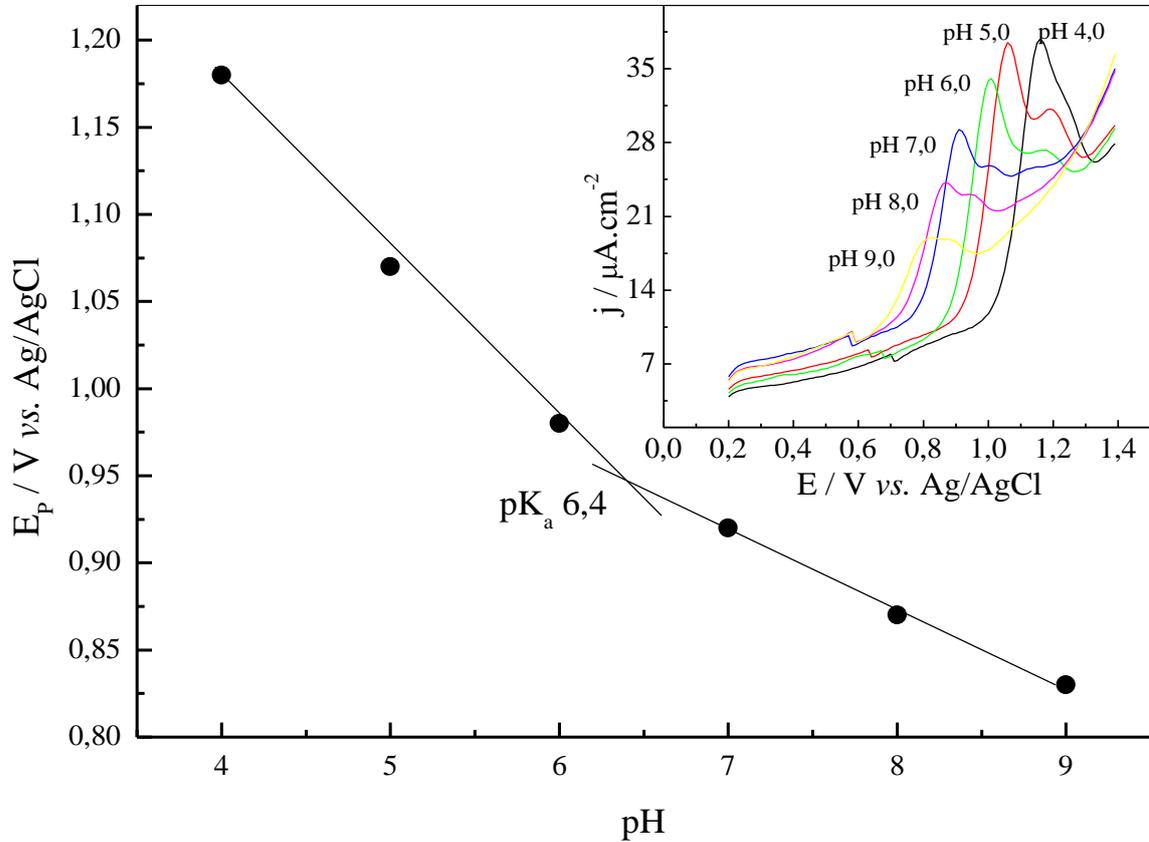


Do ponto de vista analítico, a resposta da j_p e do E_p em relação ao pH do eletrólito suporte, foi estudada de forma a otimizar um valor adequado para o desenvolvimento da metodologia de análise da danofloxacin. Conforme o que foi observado na (inserção) a j_p apresentou maior valor em pH 5,0. Além disso, o pico de oxidação da danofloxacin neste pH também apresentou boa resolução, portanto, este valor do pH foi adotado para o desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas.

⁵ Disponível em: http://www.chemicaldictionary.org/dic/D/Danofloxacin_264.html

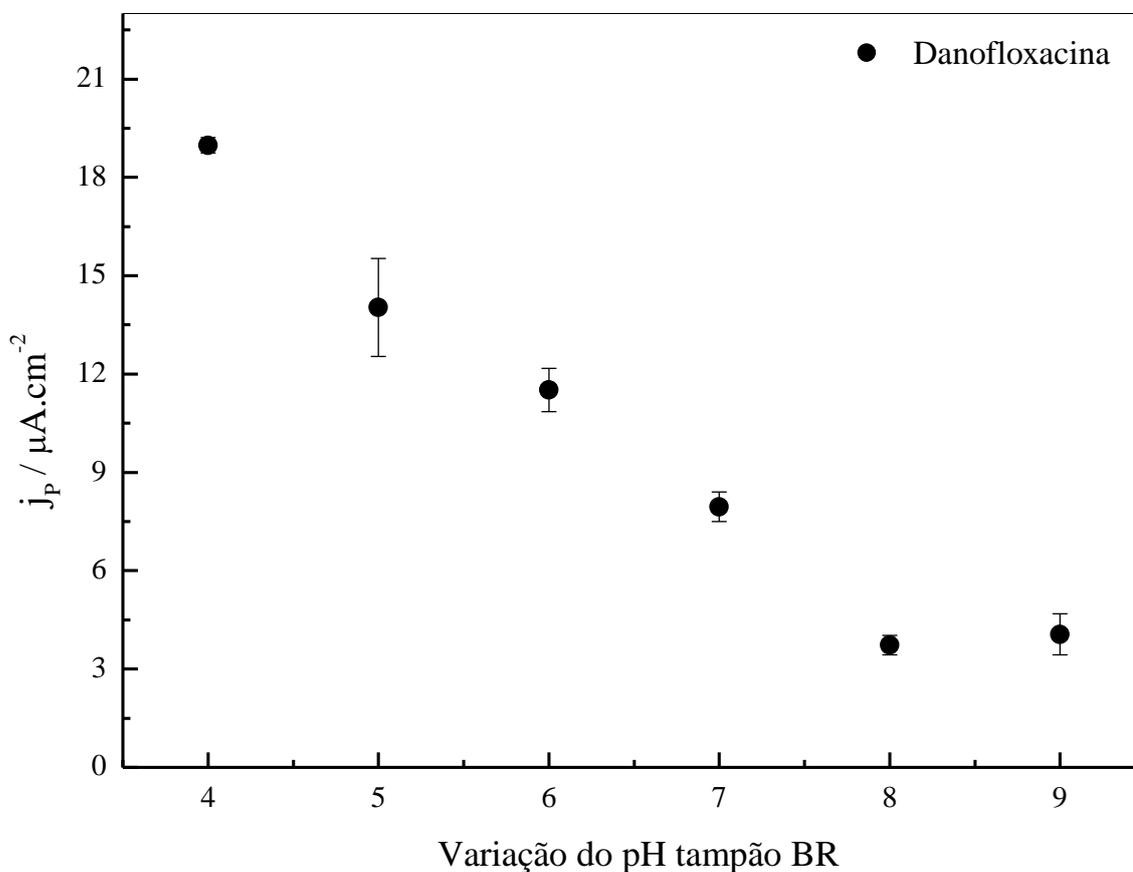
⁶ Disponível em: <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=danofloxacin&source=fp>

Figura 11: Variação do potencial de pico em função do pH para a danofloxacina ($6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Inserção: VOQ com a variação de pH em função da densidade de corrente, condições: $a = 10 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1} .



A figura seguinte (Figura 12) mostra os valores de densidade de corrente de pico para a danofloxacina e os respectivos desvios padrão entre as triplicatas das varreduras.

Figura 12: Densidade de corrente de pico para a danofloxacina, juntamente com o desvio padrão ($n = 3$) para diferentes pH do tampão BR. Danofloxacina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre ECV (eletrodo de carbono vítreo) com ΔE_s : 0,01V; a : 0,01V; f : 10,0 Hz.

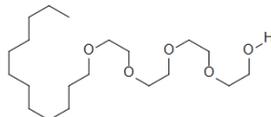
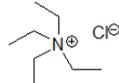
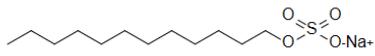


Através dos resultados, observou-se que o eletrólito suporte em pHs mais ácidos são mais apropriados para uma melhor detectabilidade da danofloxacina, como mostrado na inserção da figura anterior. No entanto, o pH 5,0 do tampão apresentou melhor perfil voltamétrico. Apesar do elevado valor de corrente de pico apresentado em pH 4, seu potencial de oxidação está em potencial muito positivo, o que é energeticamente desfavorável. Em pHs mais alcalinos do eletrólito suporte, os potenciais de pico deslocam-se para potenciais menos positivos e diminuem a corrente de pico drasticamente. Logo, devido a esses perfis, foi selecionado o pH 5,0 para os demais estudos. Em geral, valores de pH abaixo de 5,0 indicam uma maior agressividade para a reação e que favorecem processos mais severos de oxidação [50].

4.2.3. Estudo do efeito do surfactante

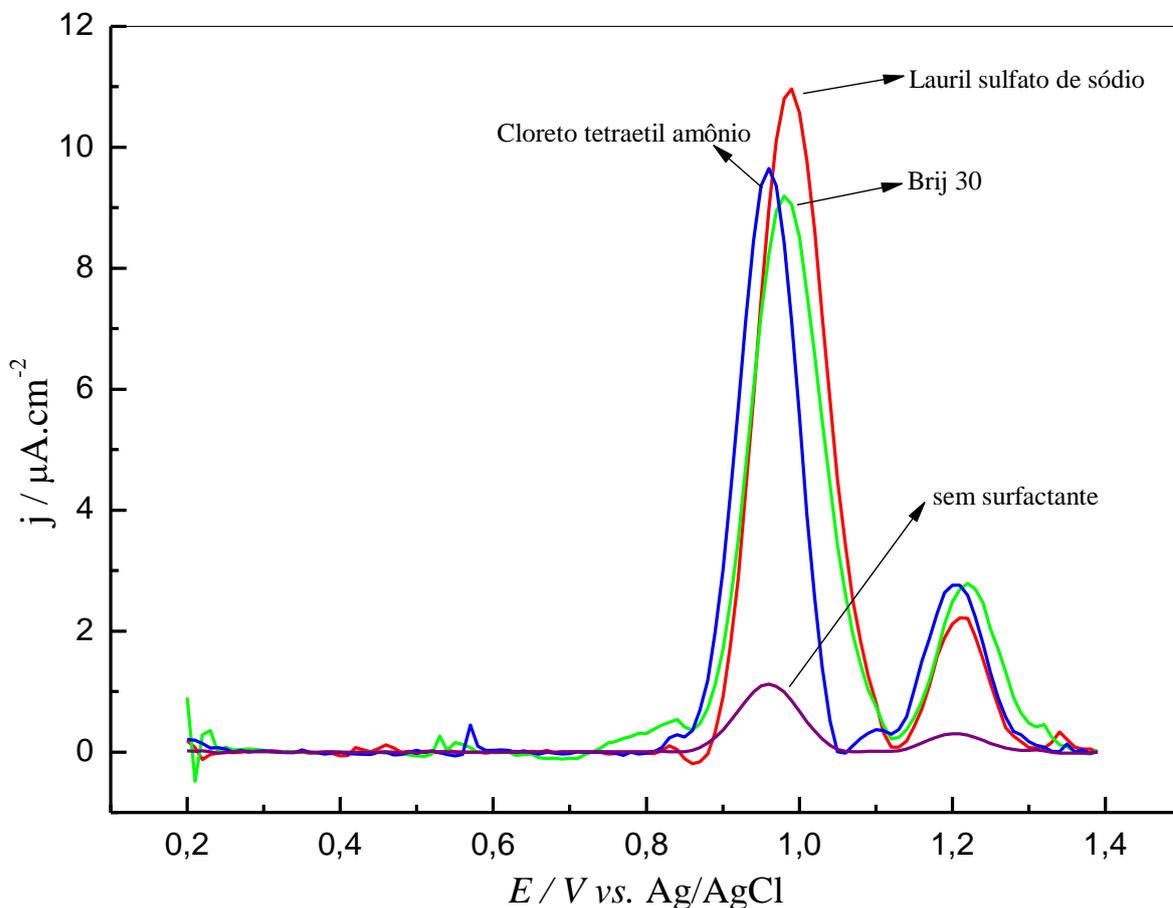
As medidas foram realizadas com 6×10^{-5} mol L⁻¹ de Danofloxacina; 2,5% de metanol; utilizando 5 mL tampão Britton Robinson pH 5,0; a concentração dos surfactantes na célula eletroquímica de 2×10^{-6} mol L⁻¹ dos seguintes surfactantes: Lauril sulfato de sódio, Brij 30 e Cloreto tetraetilamônio. Conforme citado anteriormente os surfactantes são utilizados para suprimir a perda da atividade de eletrodos sólidos pela adsorção. Além disso, a utilização do surfactante pode alterar parâmetros como corrente de pico, potencial de pico, etc [33,37]. Na Tabela 5 são apresentados os surfactantes utilizados na detecção da danofloxacina, são eles:

Tabela 5: Estrutura dos surfactantes utilizados para melhorar a detecção da fluoroquinolona danofloxacina.

Surfactante	Origem	Estrutura
Brij 30	Não iônico	
Cloreto tetraetilamônio	Catiônico	
Lauril sulfato de sódio	Aniônico	

A partir da análise dos VOQ realizados com os diferentes surfactantes (Figura 13), observou-se que 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).

Figura 13: Voltamogramas de onda quadrada para diferentes surfactantes com concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. BR pH 5,0. Danofloxacina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$; $a = 10 \text{ mV}$ e $f = 10,0 \text{ Hz}$.



Depois de escolhido o surfactante, estudou-se a melhor concentração do mesmo a ser utilizado nas medidas subsequentes. Na Tabela 6 estão apresentados os respectivos valores de densidade de corrente de pico e potencial de pico para cada concentração do surfactante Lauril sulfato de sódio utilizados.

A concentração de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante lauril sulfato de sódio foi escolhida como a melhor concentração a ser utilizada, por apresentar uma melhor separação entre os dois picos da danofloxacina e apresentar um melhor desvio padrão da densidade de corrente de pico, a CMC (Concentração Micelar Crítica) para o lauril sulfato de sódio é de $8,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, a concentração escolhida está com o comportamento ideal, que é abaixo da CMC, em concentrações acima da CMC as propriedades da solução mudam consideravelmente e resulta na formação de micelas⁷.

⁷ Disponível em: http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/12535/12535_3.PDF

O valor do potencial de pico para esta em 1,04 V e com o aumento da concentração de surfactante um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas (Tabela 7), o que não torna vantajoso a utilização de concentrações maiores.

Tabela 6: Valores de média para potencial de pico e desvio padrão ($n = 3$) para densidade de corrente de pico, para uma solução de Danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com o uso de diferentes concentrações do surfactante.

Surfactante $\mu \text{ mol L}^{-1}$	E_p (média)/ V	j_p (média)/ $\mu \text{ A.cm}^{-2}$
0,0	0,98	$1,96 \pm 0,44$
2,0	1,02	$10,12 \pm 0,61$
4,0	1,04	$10,15 \pm 0,51$
8,0	1,06	$10,64 \pm 1,31$
12,0	1,07	$10,76 \pm 0,51$
16,0	1,06	$8,47 \pm 0,52$
20,0	1,09	$10,39 \pm 1,18$

Os surfactantes foram utilizados para minimizar, ou até suprimir, a inativação da superfície eletródica ocasionada pela adsorção de produtos eletrogerados ou, até mesmo, do próprio reagente [51]. Este problema é ainda mais grave quando espécies interferentes presentes em matrizes complexas também adsorvem na superfície eletródica, inativando-a totalmente ou parcialmente. Com isso, entre os métodos utilizados para suprimir a perda da atividade de eletrodos sólidos pela adsorção destacam-se o uso de agentes tensoativos.

No caso dos surfactantes utilizados, o lauril sulfato de sódio apresentou uma melhor resposta, pois a corrente de pico de oxidação apresentou maior intensidade. O lauril sulfato de sódio é um surfactante aniônico, e suas propriedades ajudaram a inibir o processo adsorptivo [52].

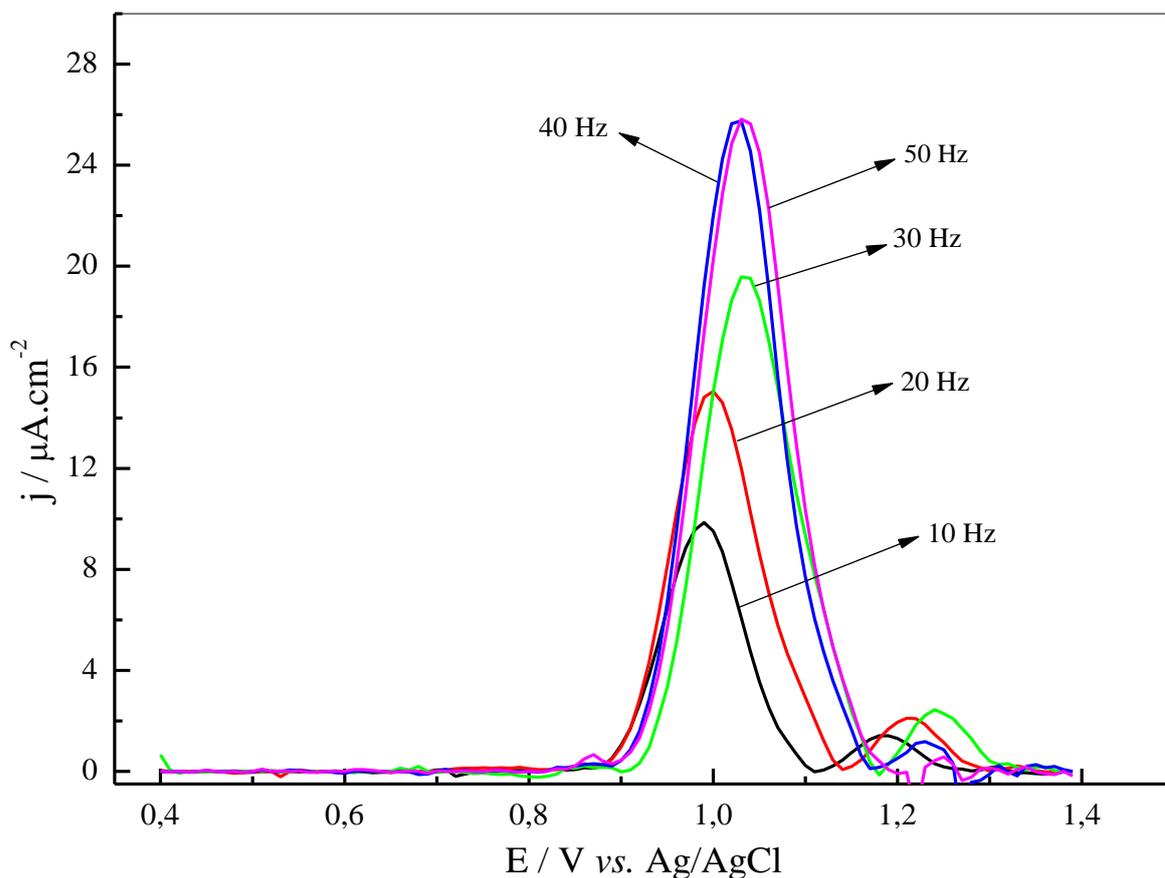
4.2.4. Otimização dos parâmetros de aplicação da VOQ para ECV

4.2.4.1. Estudo da influência de Frequência (f)

A frequência de aplicação de pulsos de potencial 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 [27]. A Figura 14 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a danofloxacina em função da variação da frequência. Observa-se que,

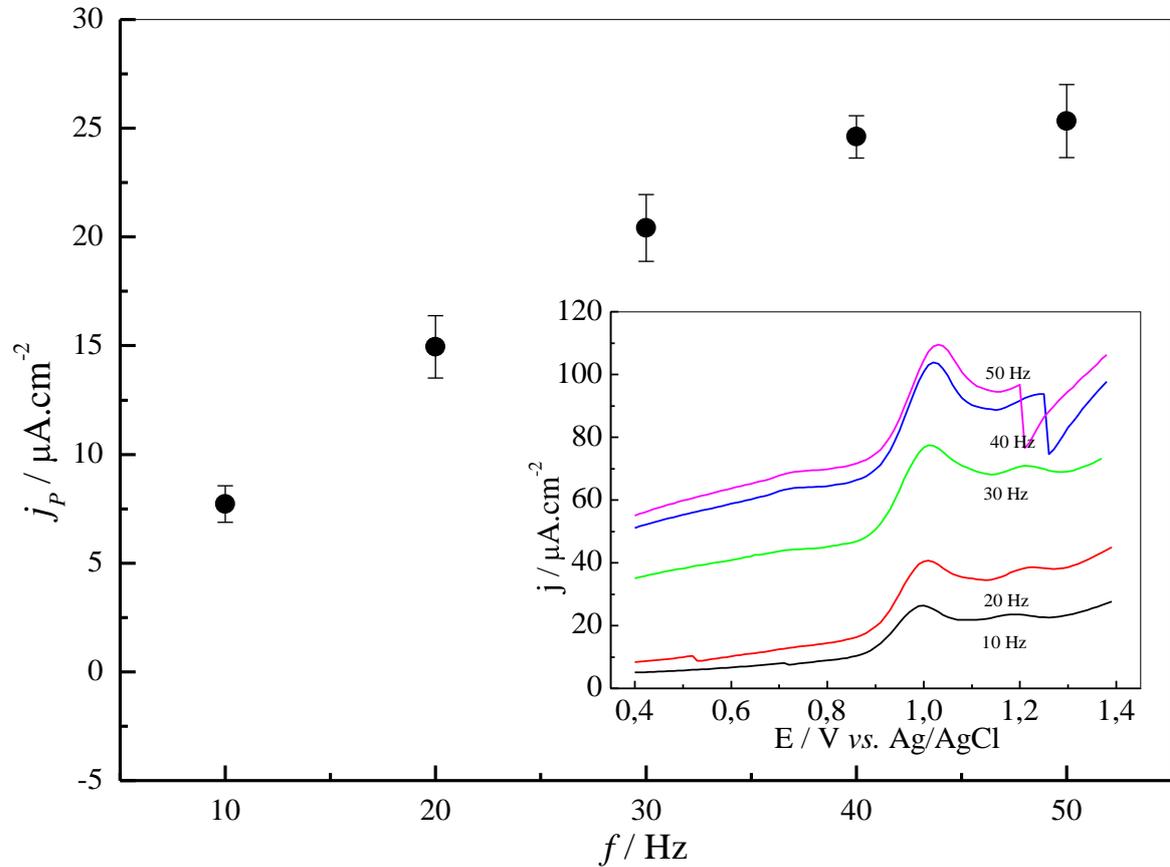
com o aumento no valor da frequência, ocorre um aumento proporcional na intensidade de densidade de corrente de pico e também ocorre o deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais positivas.

Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a detecção da danofloxacin $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, BR pH 5,0 registrados com diferentes frequências com $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e $a = 10 \text{ mV}$, Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} .



A dependência da densidade de corrente de pico em função da frequência (f) para uma solução de Danofloxacin é mostrada na Figura 15. Como observado, quanto maior a frequência, maior o valor de corrente. No entanto, observa-se também há um aumento da corrente residual, inserção da Figura 15. Optou-se então por utilizar a frequência de 20 Hz, para que não tenha interferência de corrente residual em medidas posteriores.

Figura 15: Dependência da densidade de corrente de pico (j_p) em função da frequência no eletrólito de suporte para a detecção da DANO em tampão BR pH 5,0. Inserção: VOQ registrados para diferentes frequências, com $\Delta E_s = 10$ mV e $a = 10$ mV.

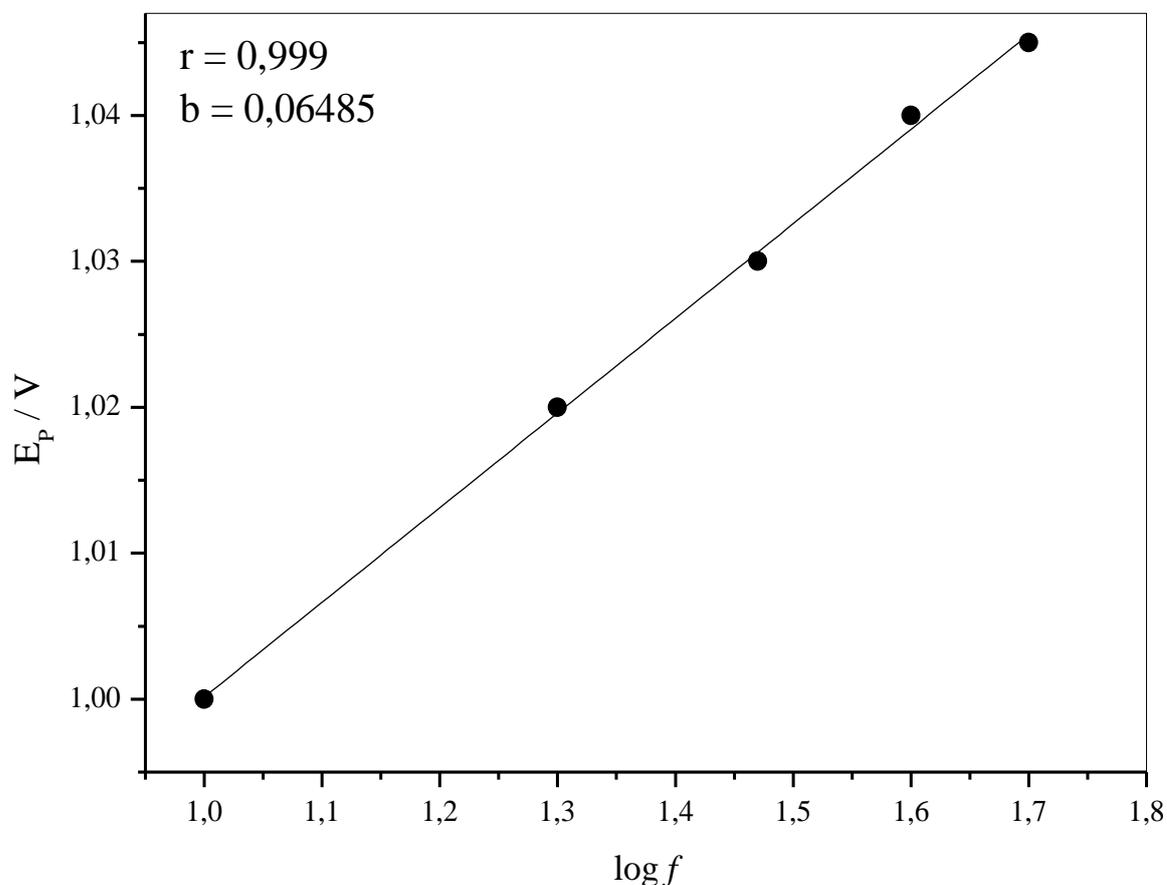


De acordo com os critérios da voltametria de onda quadrada, a dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da frequência para reações totalmente irreversíveis com reagentes e/ou produtos adsorvidos é linear e apresenta uma inclinação de [53]:

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = \frac{2,3 RT}{\alpha n F}$$

Sendo que: α é o coeficiente de transferência eletrônica e n o número de elétrons envolvidos na reação eletrodica. A Figura 16 apresenta o comportamento do potencial de pico em função do logaritmo de frequência, para a danofloxacina.

Figura 16: Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência da onda quadrada.



Observa-se um comportamento linear com inclinação de 0,06485. Aplicando-se a equação anterior se obtém um $an = 0,91$, o que corresponderia a um valor de α de 0,45 e dois elétrons por molécula de danofloxacina envolvidos no processo de oxidação.

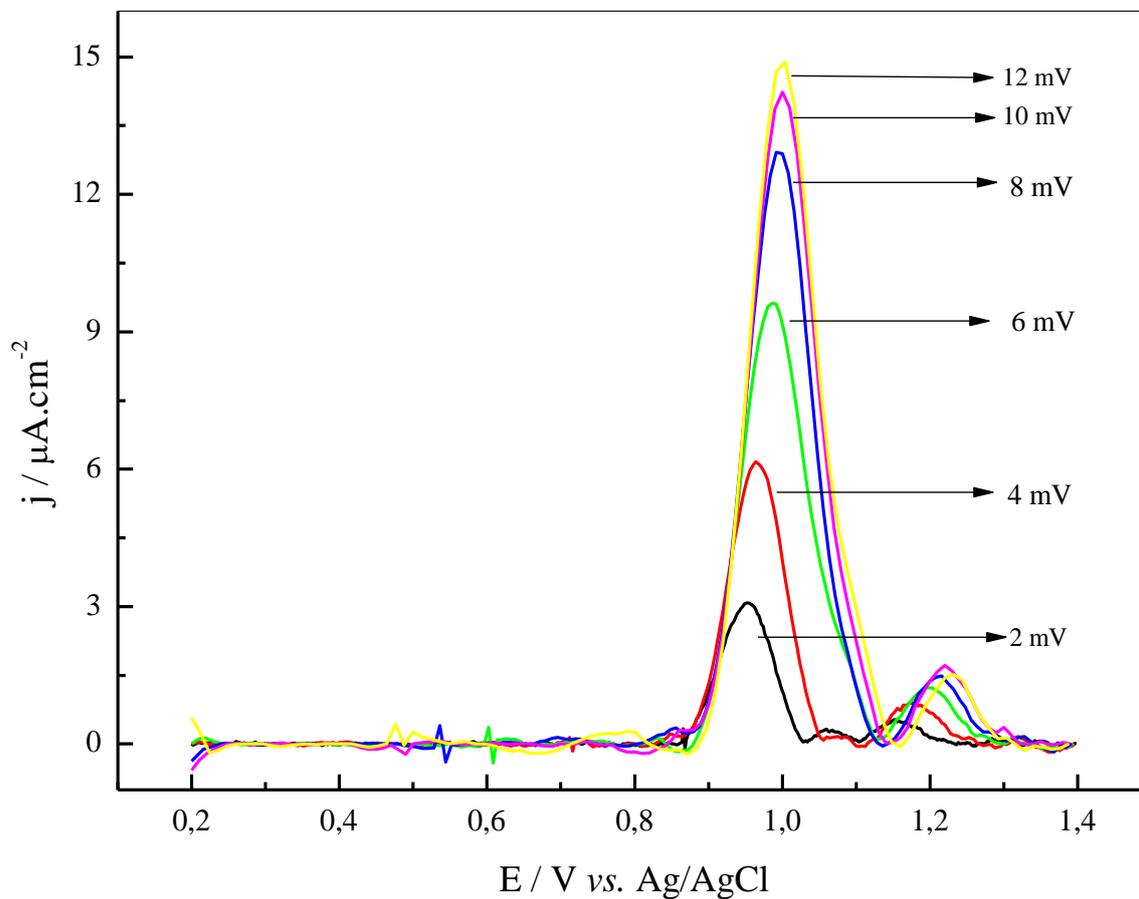
4.2.4.2. Estudo do incremento de potencial (ΔE_s)

Na VOQ a velocidade efetiva é o resultado do produto de frequência de pulsos de potencial (f) pelo incremento de varredura de potencial (ΔE_s). Deste modo com ΔE_s maior pode melhorar a sensibilidade do método. No entanto, com ΔE_s maiores pode ocorrer alargamento nos picos e conseqüentemente, a resolução ser comprometida [32].

A Figura 17 apresenta os voltamogramas de onda quadrada de danofloxacina registrados com diferentes valores de ΔE_s . De acordo com os dados obtidos, a corrente de pico aumenta continuamente com o aumento do incremento de potencial. Entretanto, uma melhor definição de j_p é obtida até 8 mV, em valores maiores de incremento de potencial a densidade

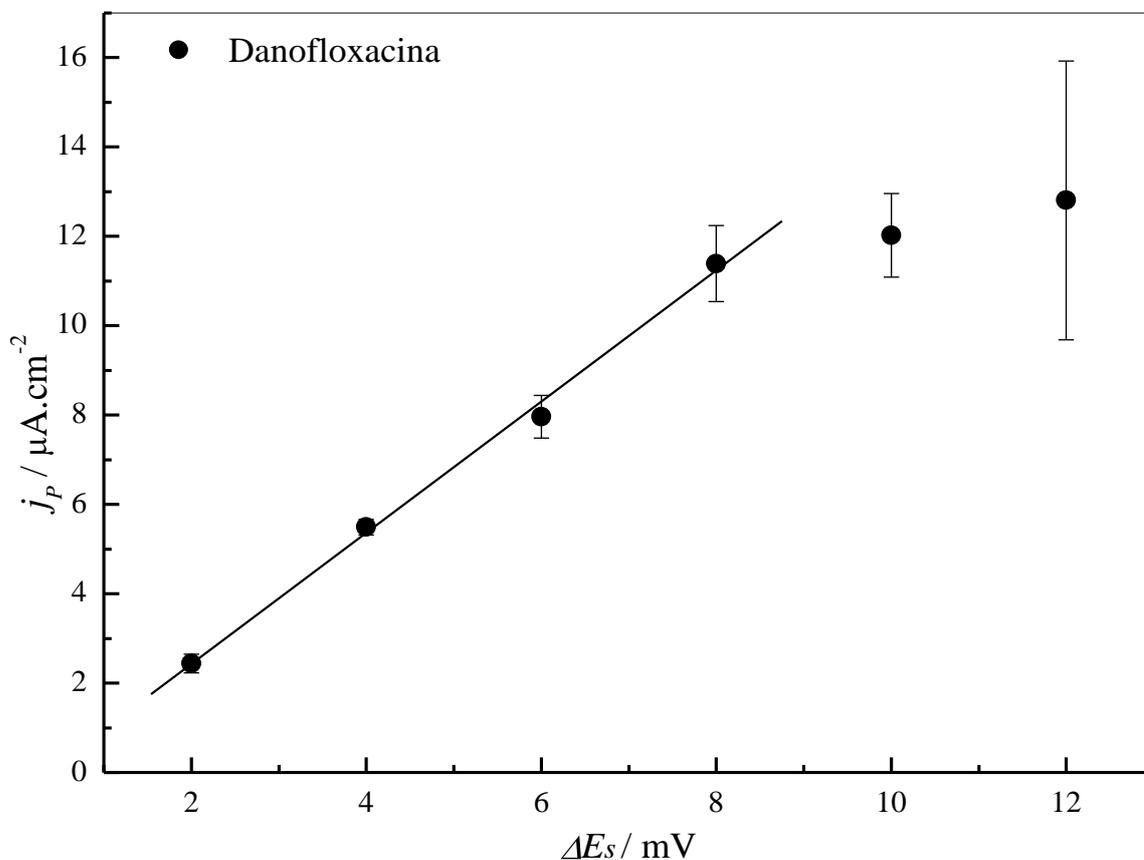
de corrente de pico não aumenta significativamente e nota-se um alargamento do pico de oxidação em ΔE_s , maiores que 8 mV.

Figura 17: VOQ obtidos para a detecção de danofloxacin $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. BR pH 5,0 registrados com diferentes incrementos de potencial. $f = 20 \text{ Hz}$ e $a = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L⁻¹.



Verifica-se que a partir do incremento de potencial de 8 mV há aumento no desvio padrão entre as triplicatas, como pode ser observado na Figura 18.

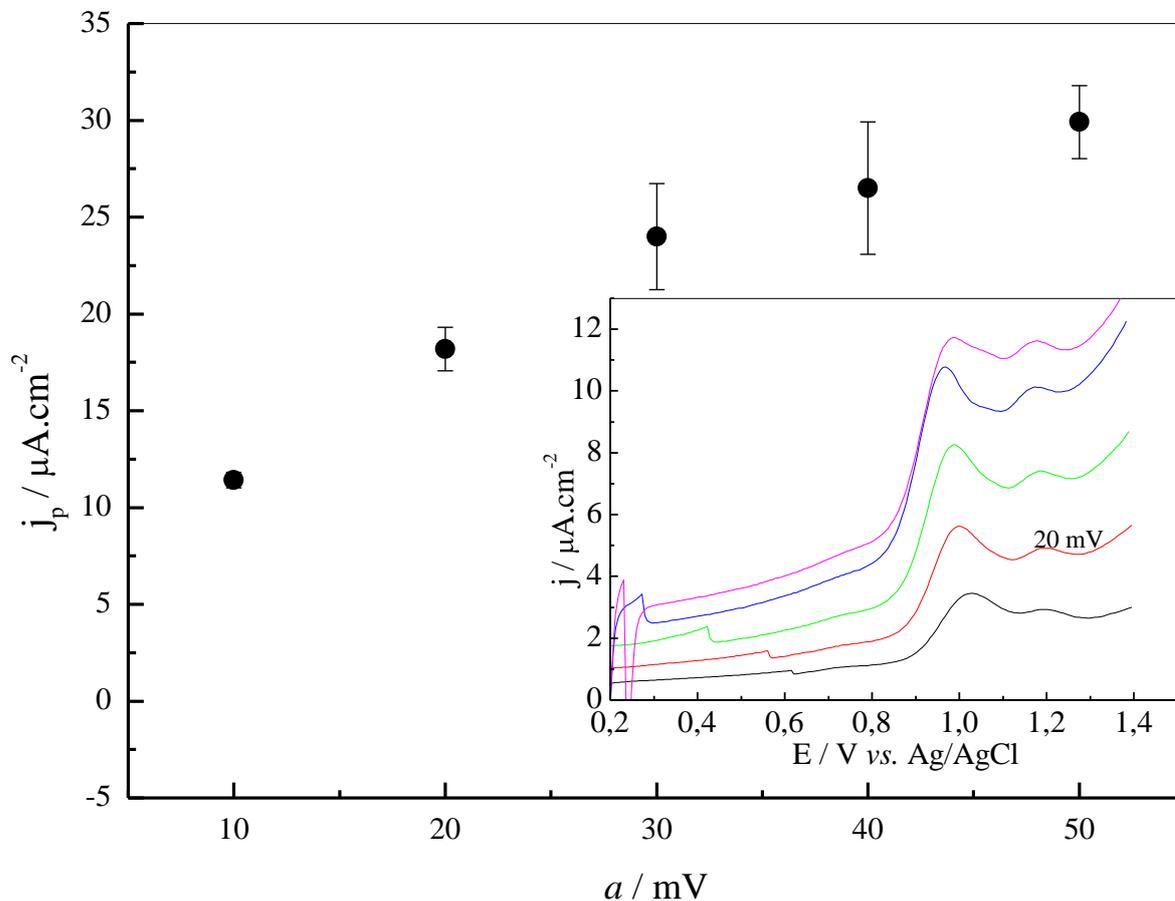
Figura 18: Dependência da densidade de corrente de pico j_p em função da altura de degrau no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) registrados com diferentes alturas de degrau. Condições: $t_{eq} = 15\text{s}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $a = 10 \text{ mV}$, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 M.



4.2.4.3. Estudo da influência da amplitude (a)

Outro parâmetro também avaliado na oxidação da danofloxacina foi à influência da amplitude de aplicação de pulso de potencial. Como é possível constatar, a partir da análise da Figura 19, a j_p aumenta continuamente com valores de amplitude de 10 a 30 mV, a partir deste valor observa-se aumento do desvio padrão na densidade de corrente de pico, o que não torna vantajoso o uso de amplitudes maiores. A amplitude de 20 mV foi selecionada para prosseguir com os demais estudos, pois se observarmos na inserção da Figura 19 em amplitudes maiores que 20 mV um aumento da corrente residual, o que prejudica as posteriores medidas.

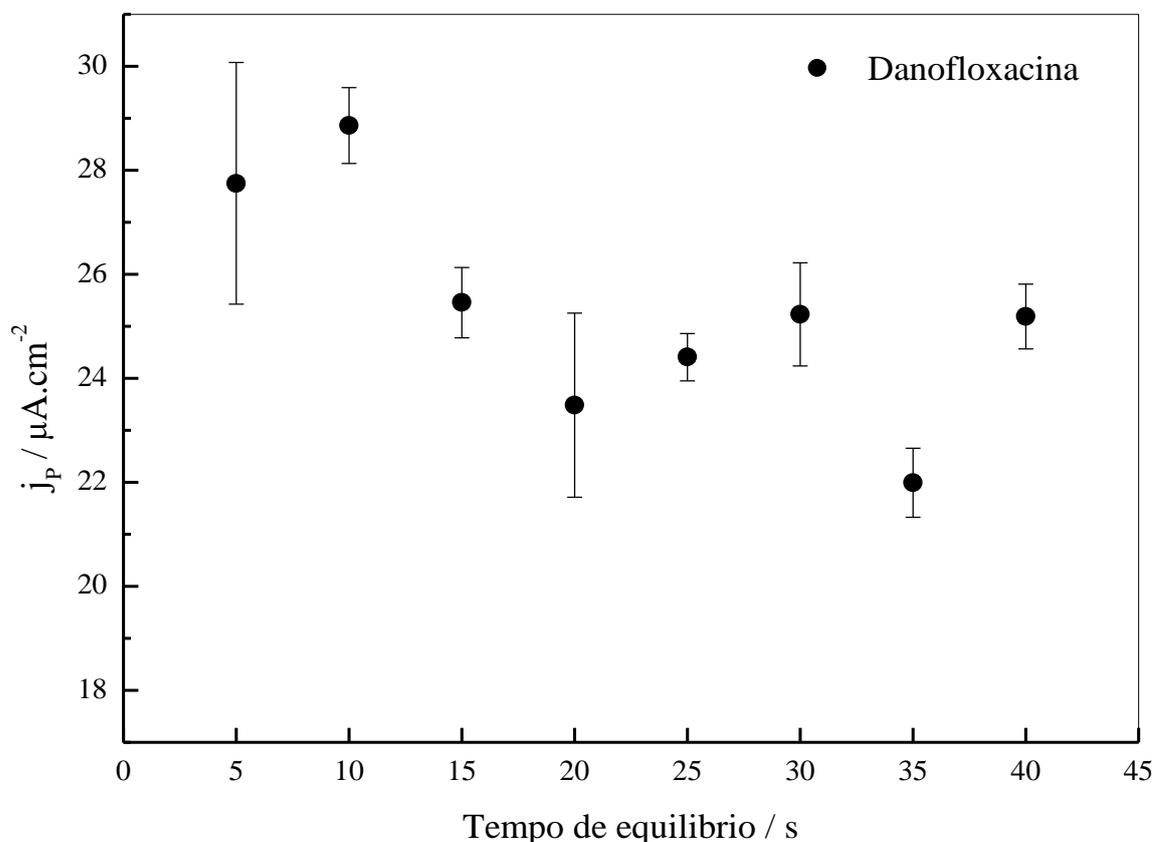
Figura 19: Dependência da densidade de corrente de pico j_p em função da amplitude no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacin em BR pH 5,0, registrados com diferentes amplitudes. Inserção: VOQ registrados para diferentes amplitudes, com $f = 20$ Hz e $\Delta E_s = 8$ mV, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. Ag/AgCl, KCl 3 mol L⁻¹.



4.2.4.4. Estudo do tempo de equilíbrio (t_{eq})

A partir da análise da Figura 20 mostra um pequeno aumento da corrente de pico da danofloxacin com o tempo de equilíbrio de 10 s. Portanto, o tempo de equilíbrio de 10 s foi considerado ótimo.

Figura 20: Dependência da corrente de pico j_p em função do tempo de equilíbrio no eletrólito suporte BR para a detecção de danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) registrados com diferentes tempos de equilíbrio. Condições $a = 20\text{mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$.



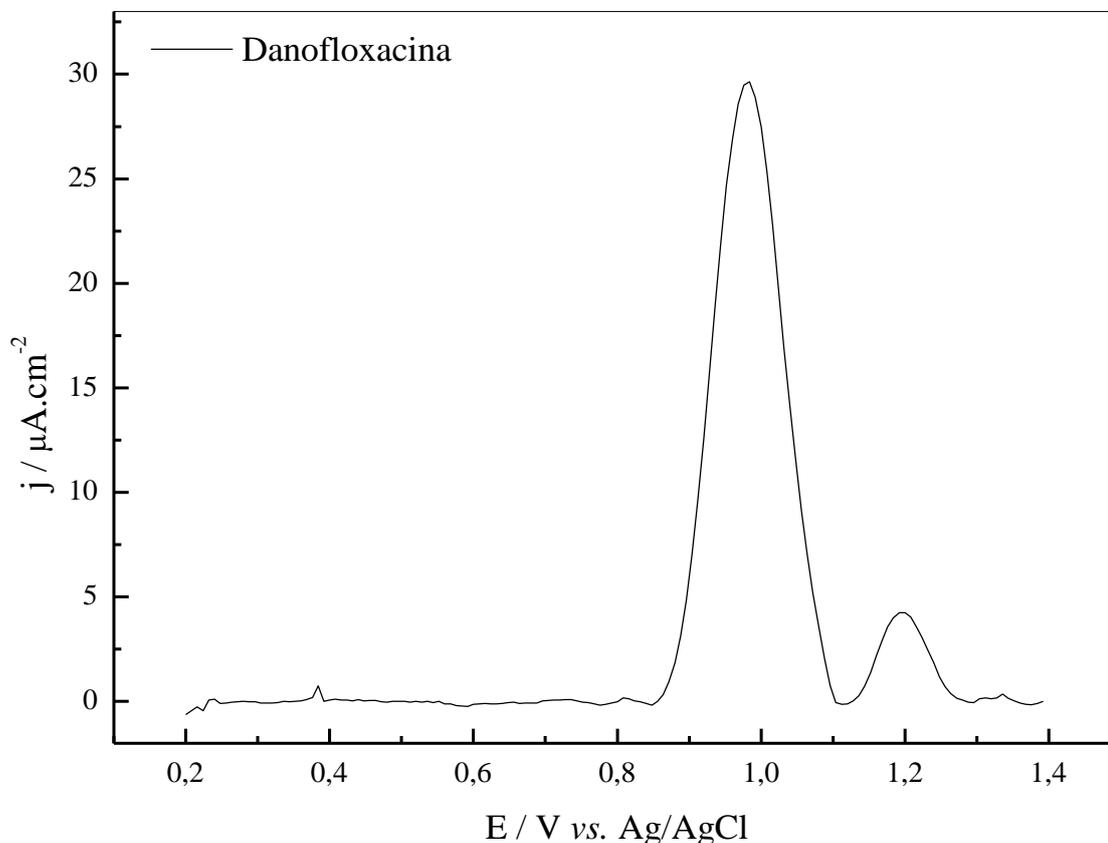
4.2.5. Parâmetros Seleccionados para ECV

Os parâmetros otimizados, bem como os demais utilizados no desenvolvimento desta metodologia são apresentados na Tabela 7, e nessas condições otimizadas voltamograma para detecção de danofloxacina é apresentado na Figura 21.

Tabela 7: Parâmetros seleccionados para a análise de Danofloxacina através da metodologia eletroanalítica utilizando eletrodo de carbono vítreo sob a técnica de VOQ.

Parâmetros	Parâmetro seleccionado
Britton Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	pH 5,0
Surfactante	Lauril sulfato de sódio
Concentração do surfactante	$4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Frequência do pulso	20 Hz
Amplitude do pulso	20 mV
Incremento de potencial	8 mV
Tempo de equilíbrio	10 s

Figura 21: Voltamograma de onda quadrada obtidos para a detecção da danofloxacina $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido no eletrólito (tampão BR, pH = 5,0) com as melhores condições encontradas. Condições: 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 M.



4.3. Estudos empregando EPC e EPCM

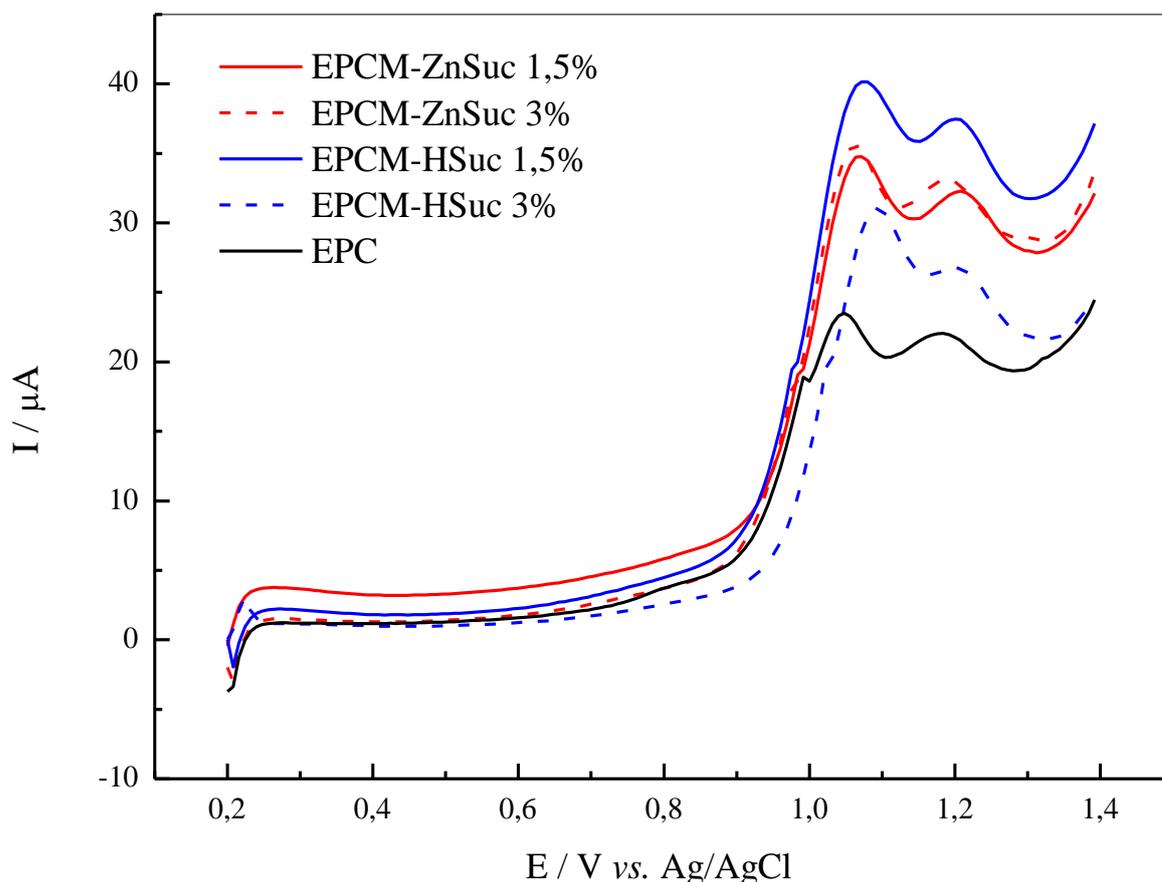
Nos últimos anos, os eletrodos de pasta de carbono modificados têm atraído interesse devido às suas aplicações potenciais em diversas análises. Modificações da matriz de pasta com vários complexos de metais de transição e nanotubos de carbono foram relatadas nos últimos anos. Estes eletrodos têm sido utilizados em eletroanálise devido à sua capacidade de catalisar o processo redox de algumas moléculas de interesse, uma vez que facilitam a transferência de elétrons. Esses tipos de eletrodos são baratos e possuem muitas vantagens, tais como, baixa corrente de fundo, ampla janela de potencial (em ambas as regiões catódica e anódica), fácil fabricação e renovação de superfície[41].

Devido a esse eletrodo ser de fácil confecção e apresentar as vantagens descritas acima foram realizados estudos envolvendo a determinação analítica da danofloxacina utilizando esses eletrodos confeccionados utilizando como modificador o ácido succínico e complexos succinatos de ferro e zinco.

4.3.1. Estudo da melhor composição em porcentagem de modificador para EPCM

Antes de construirmos as curvas analíticas testou-se qual a melhor composição das EPCM em porcentagem de modificador, pois as proporções do modificador podem influenciar na condutividade do eletrodo, assim como nas características físicas, em que pode haver esfrelamento do eletrodo quando em contato com o eletrólito. A figura seguinte mostra a resposta eletroquímica da detecção da danofloxacina quando se utiliza diferentes proporções do modificador.

Figura 22: VOQ para detecção da danofloxacina em eletrodos com distintas porcentagens dos modificadores de EPC. Condições: 2,5% de metanol, 4×10^{-6} mol L⁻¹ de surfactante lauril sulfato de sódio, $t_{eq} = 10$ s, $a = 20$ mV, $f = 20$ Hz e $\Delta E = 8$ mV.



A observarmos a Figura 22, notamos que a proporção de 1,5% apresenta maior intensidade da detecção para a fluoroquinolona danofloxacina, então as curvas analíticas

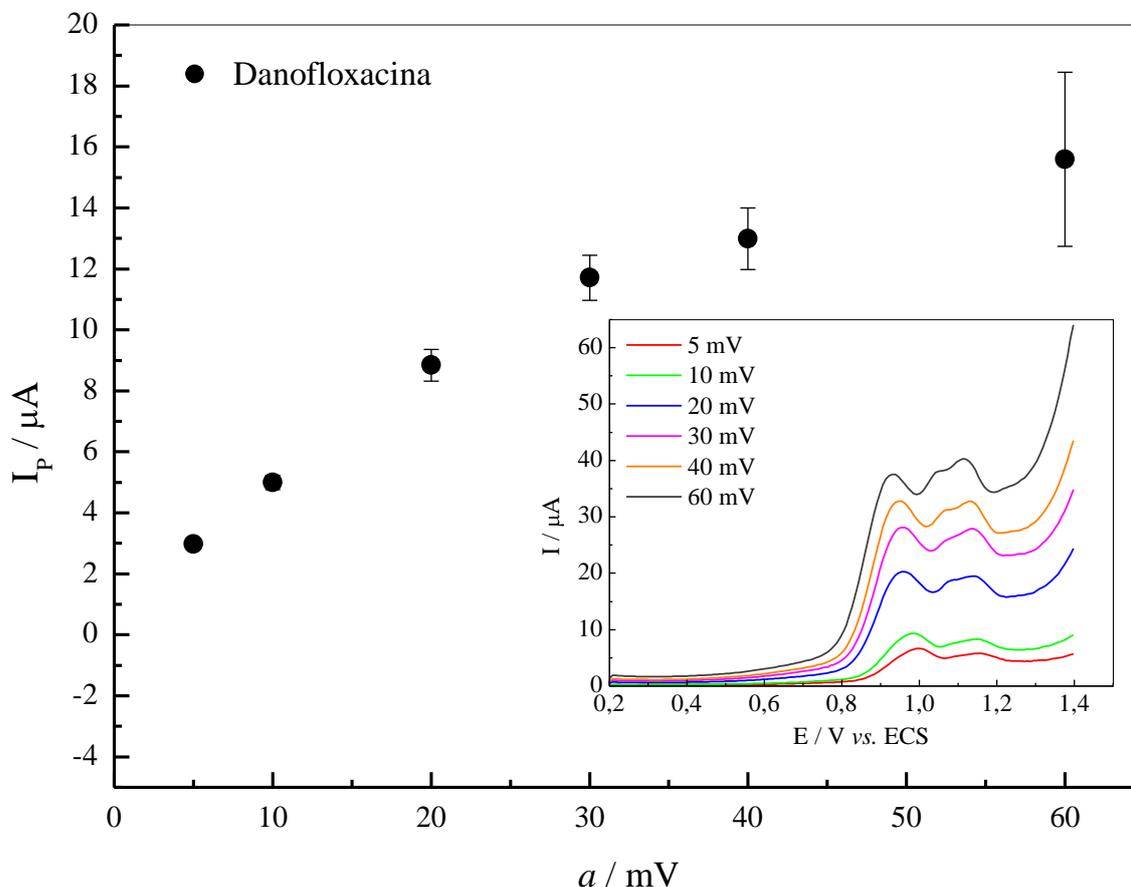
deverão ser construídas com porcentagem de 1,5% do modificador, as proporções de óleo mineral e pó grafite estão descritos na

4.3.2. Otimização dos parâmetros de aplicação da VOQ para EPC

A otimização realizada com o eletrodo de trabalho de pasta de carbono variou apenas a amplitude (a). Os demais parâmetros foram mantidos iguais aos do ECV.

A Figura 23 apresenta os resultados desse estudo. Constata-se o aumento da corrente de pico da danofloxacina linearmente com a elevação do valor de amplitude até 60 mV. No entanto, após 30 mV o desvio padrão foi aumentando, como pode ser observado na figura abaixo. Verifica-se que a amplitude em 10 mV possibilita detecção com intensidade de pico do danofloxacina significativa, sem valor elevado da corrente residual e com baixo desvio padrão entre três medidas, indicando uma boa repetibilidade nessas condições. Em medidas utilizando o EPC a superfície é renovada (por polimento) a cada medida eletroquímica e com área ativa desconhecida, então a maneira encontrada para minimizar erros é utilizar uma baixa amplitude. Portanto, a amplitude de 10 mV foi considerada ideal para se trabalhar com as EPCM e EPC.

Figura 23: Dependência da corrente de pico I_p em função da amplitude no eletrólito de suporte para a detecção de danofloxacina em BR pH 5,0, registrados com diferentes amplitudes. Inserção: VOQ com EPC, registrados para diferentes amplitudes, com $f = 20$ Hz e $\Delta E_s = 8$ mV, intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.



4.3.3. Parâmetros selecionados para EPC e EPCM

Os parâmetros otimizados, bem como os demais utilizados no desenvolvimento desta metodologia são apresentados na seguinte tabela (Tabela 8):

Tabela 8: Parâmetros selecionados para a análise de Danofloxacina por VOQ utilizando EPC e EPCM.

Parâmetros	Selecionado
Britton Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	pH 5,0
Surfactante	Lauril sulfato de sódio
Concentração do surfactante	$4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Frequência do pulso	20 Hz
Amplitude do pulso	10 mV
Incremento de potencial	8 mV
Tempo de equilíbrio	10s

4.4. Estudos para a determinação da Danofloxacin em ECV

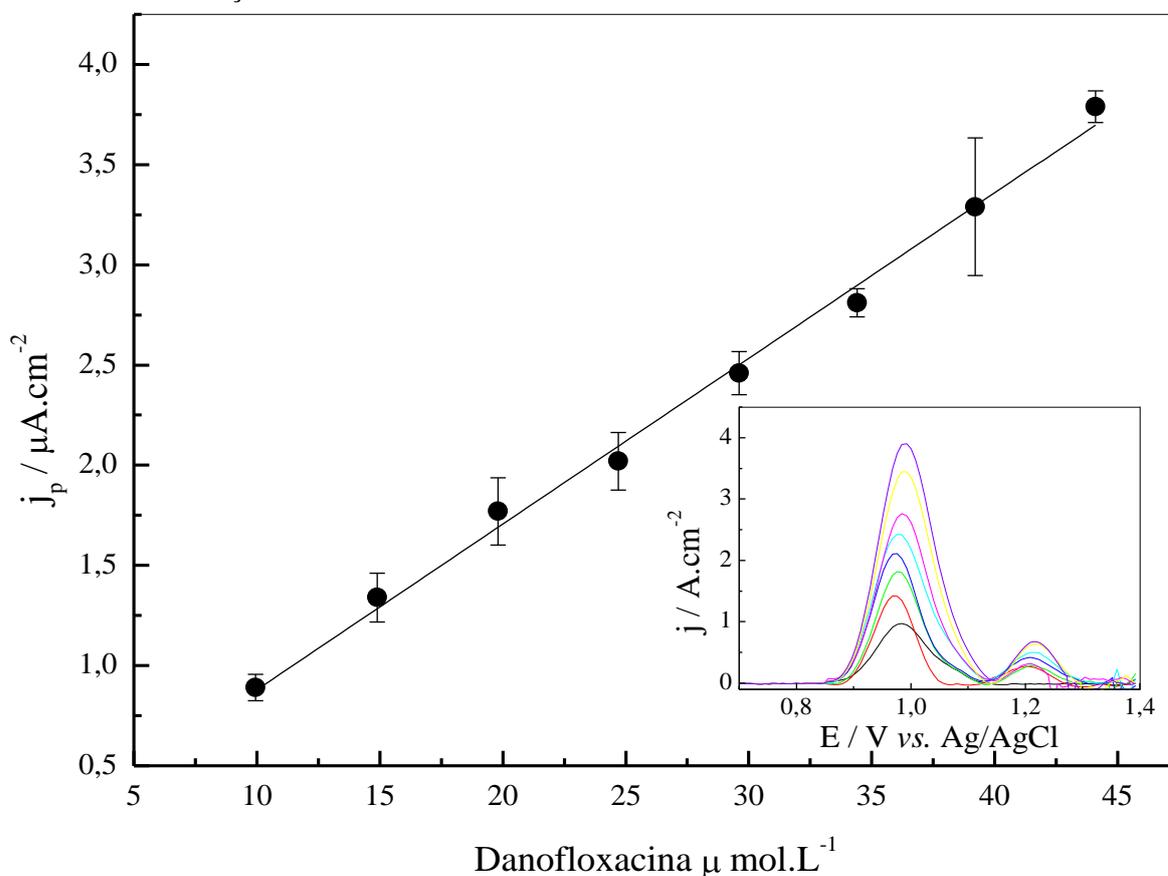
As curvas de calibração foram construídas empregando o método da curva de calibração e, neste procedimento, alíquotas da solução estoque do analito de concentração conhecida foram adicionadas à célula eletroquímica e, imediatamente após cada adição, um voltamograma era obtido. Em seguida foi verificada a correlação entre intensidade da corrente de pico e concentração de danofloxacin.

A relação matemática proveniente da correlação é chamada de curva analítica. 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 [54]. 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 [55].

4.4.1. Curva de calibração empregando ECV

A concentração de danofloxacin foi variada no intervalo de $9,95 \times 10^{-6}$ a $4,41 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A Figura 24 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de danofloxacin.

Figura 24: Curva de calibração para danofloxacina em BR pH 5,0 com concentrações variando de $9,95 \times 10^{-6}$ a $4,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ e $t_{eq} = 10 \text{ s}$. Inserção: VOQ em diferentes concentrações.



A partir da inserção da Figura 21 foi possível observar que não houve deslocamento dos potenciais de pico e que há um crescimento da corrente de pico em função da concentração. 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 21 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.

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 [54]:

$$LD = \frac{3xS_b}{s}$$

$$LQ = \frac{10xS_b}{s}$$

Na qual, 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 9 a seguir.

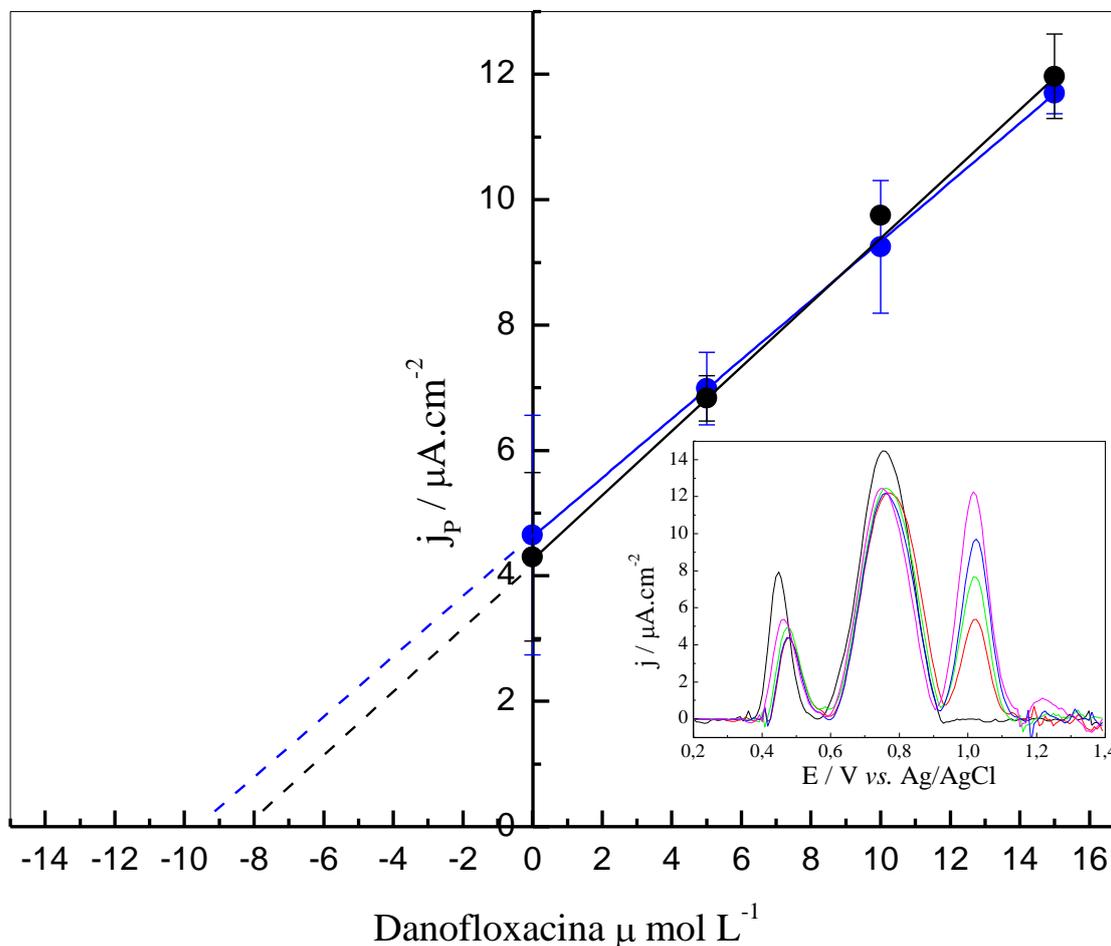
Tabela 9: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas obtidos na determinação de danofloxacinna empregando VOQ.

Parâmetros	Valores encontrados
Faixa de linearidade ($\mu \text{ mol L}^{-1}$)	9,95 a 44,1
Equação da curva	$j (A) = 0,05357+0,082 [\text{DANO}]$
r	0,998
LD ($\mu \text{ mol L}^{-1}$)	2,47
LQ ($\mu \text{ mol L}^{-1}$)	8,26

4.4.2. Determinação da danofloxacinna em amostras de urina bovina com ECV

Os voltamogramas e a curva com o método de adição de padrão em amostra de urina bovina são mostrados na Figura 25. Conforme apresentado, o pico da danofloxacinna está presente em aproximadamente 1,0 V, o aumento do pico é devido à sucessiva adição do padrão danofloxacinna. A amostra de urina fortificada com a danofloxacinna foi adicionada na célula eletroquímica de forma que a concentração na célula se encaixe dentro da faixa de linearidade da curva de calibração.

Figura 25: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em urina bovina ($n = 3$). Inserção: VOQ obtidos para as concentrações de $4,77 \times 10^{-6}$ a $14,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ 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 10 apresenta os dados da duplicata obtidos por voltametria de onda quadrada obtidos em amostras de urina bovina.

Tabela 10: Resultados de recuperação para Danofloxacin em amostra de urina bovina obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.

Replicata	[DANOFLOXACINA] $\mu\text{mol L}^{-1}$		Rec. (%)
	adicionada	encontrada	
1		7,71	82,63
2	9,33	9,79	104,93
Média		$8,75 \pm 1,47$	93,78

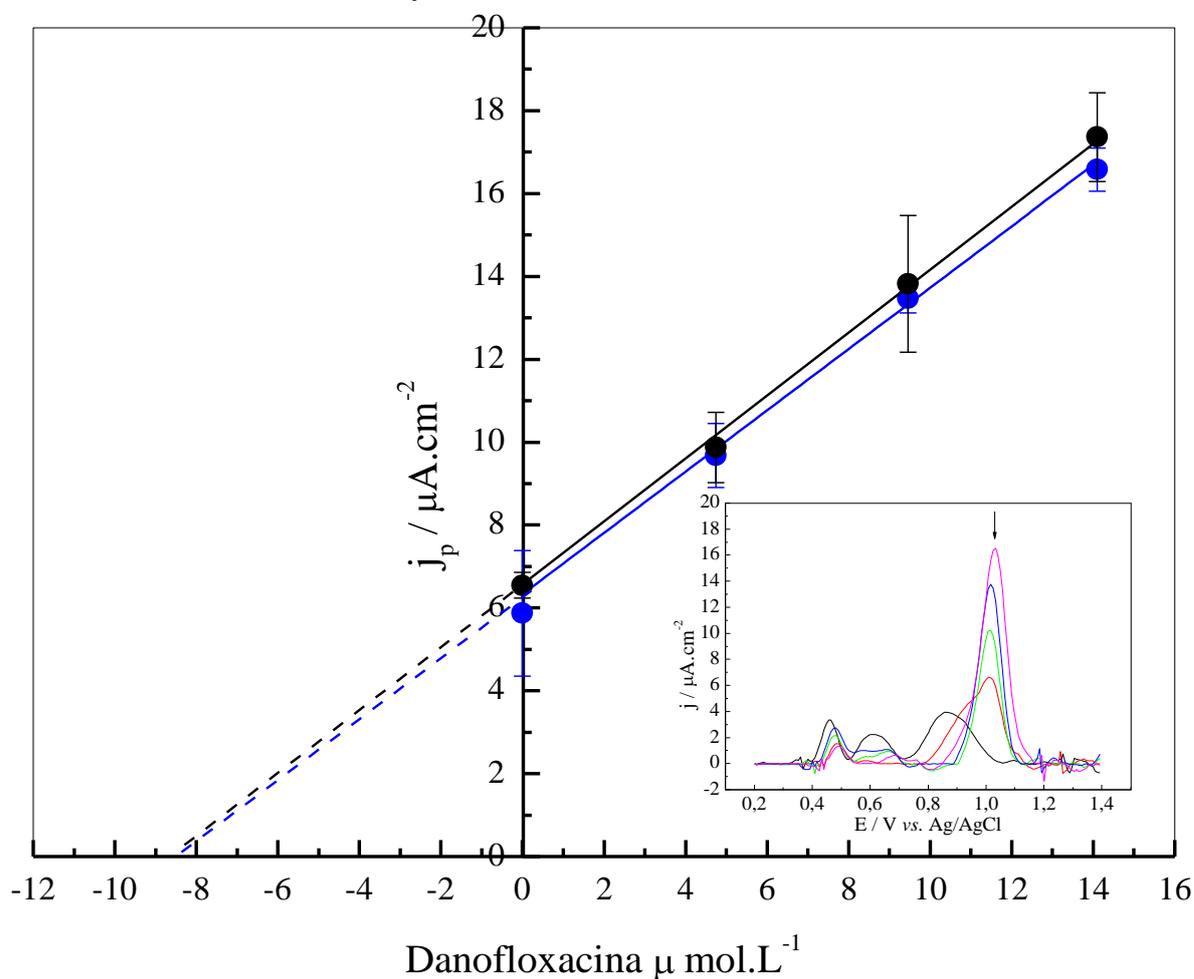
A partir dos resultados obtidos observa-se a boa recuperação obtida para as amostras reais de urina, como apresentado na inserção da Figura 25, dois primeiros picos possivelmente se deve a presença de aminoácidos e ácido úrico contido na urina. No terceiro pico

(danofloxacin) em aproximadamente 1,0 V observa-se o aumento da corrente de pico com o aumento da concentração do padrão.

4.4.3. Determinação da danofloxacin em amostras de urina suína com ECV

Os VOQs e a curva de adição de padrão de DANO em amostra de urina suína são mostrados na Figura 26.

Figura 26: Relação entre corrente de pico e concentração de danofloxacin 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^{-1} 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 11 apresenta os dados em duplicata obtidos por voltametria de onda quadrada obtidos em amostras de urina suína.

Tabela 11: Resultados de recuperação para danofloxacina em amostra de urina suína obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.

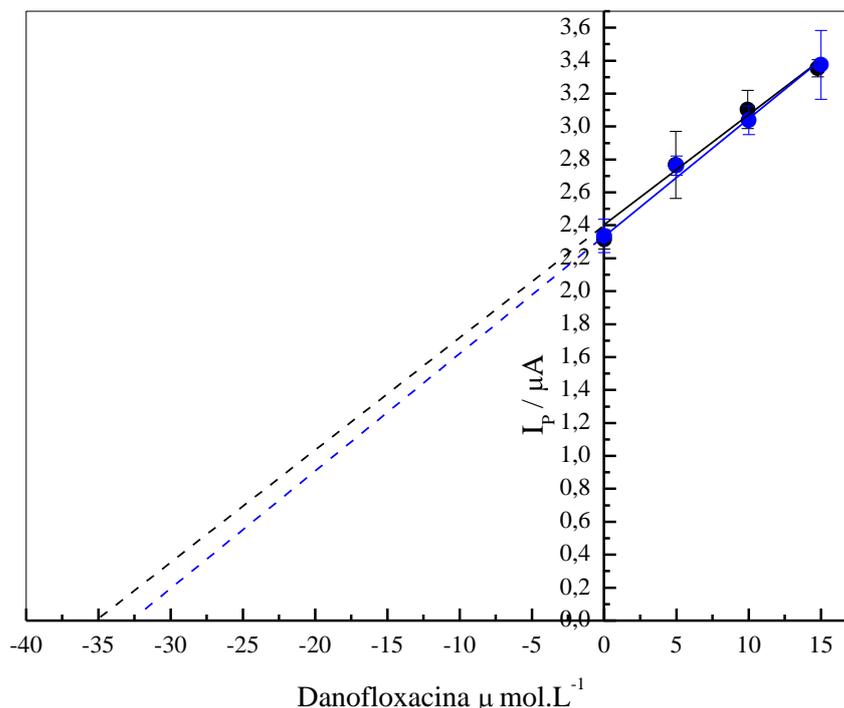
Replicata	[DANOFLOXACINA] $\mu\text{ mol L}^{-1}$		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada	
1		8,55	98,6
2	8,67	8,57	98,8
Média		8,56±0,014	98,7

A partir dos resultados obtidos observa-se boa recuperação obtida para as amostras reais de urina suína, como apresentado na inserção da Figura 26, os dois primeiros picos possivelmente se deve 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 danofloxacina está em potenciais mais positivos, ou seja, com a adição da urina deslocou o potencial de oxidação do antibiótico, de 0,98V para 1,03V.

4.4.4. Determinação analítica do Advocin® (2,5 %) por ECV

A determinação analítica do fármaco que contém o princípio ativo danofloxacina (comercializado na forma de mesilato) foi analisado utilizando o eletrodo de carbono vítreo pela técnica de adição de padrão. A curva analítica de adição de padrão obtida é mostrada na figura seguinte e em seguida a tabela com os valores obtidos para determinação do fármaco Advocin®.

Figura 27: Curva de adição de padrão para determinação de DANO no fármaco Advocin® em ECV. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.



A tabela seguinte mostra os valores obtidos na determinação da danofloxacina na formulação farmacêutica.

Tabela 12: Resultados de recuperação para o fármaco Advocin® obtidos por voltametria de onda quadrada sobre ECV.

Replicata	[Advocin®] $\mu\text{mol L}^{-1}$		Enc. (%)
	Rotulada	Encontrada	
1		35,32	632,97
2	5,58	33,13	593,72
Média		34,22 \pm 1,55	613,34

Podemos observar tanto pela tabela quanto pela figura 27 que o fármaco apresentou elevada recuperação, o pico de oxidação da danofloxacina apresentou intensidade muito maior do que quando apenas analisando o padrão da danofloxacina. Acredita-se que isso ocorreu devido ao medicamento ser líquido, já que é solução injetável e que na composição do medicamento alguns excipientes e ser comercializado da forma de mesilato de danofloxacina, na qual não conseguimos a ter acesso a composição possam ter intensificado o pico de oxidação da danofloxacina, devido a esse fato não analisamos com os demais eletrodos EPC e EPCM.

4.5. Determinação analítica da Danofloxacin em EPC e EPCM

As curvas de calibração para o EPC e os EPCMs são apresentadas na Figura 28, onde os parâmetros obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Foi possível observar que não houve deslocamento significativo dos potenciais de pico com o uso do modificador, mas notou-se aumento na da corrente de pico em função da concentração. 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 seguinte apresenta as curvas de calibração com os valores médios ($n = 3$) de corrente de pico e com os respectivos desvios padrão para cada ponto da curva obtida para danofloxacin sobre os EPCM, a partir dessas figuras podem-se extrair vários dados, que são apresentados na Tabela 13.

Figura 28: Curvas analíticas para danofloxacin em **A** para EPC; **B** = EPCM-HSuc; **C** = EPCM-ZnSuc; **D** = EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com concentrações variando de $1,3 \times 10^{-7}$ a $1,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV, $\Delta E_s = 8$ mV e $t_{eq} = 10$ s. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.

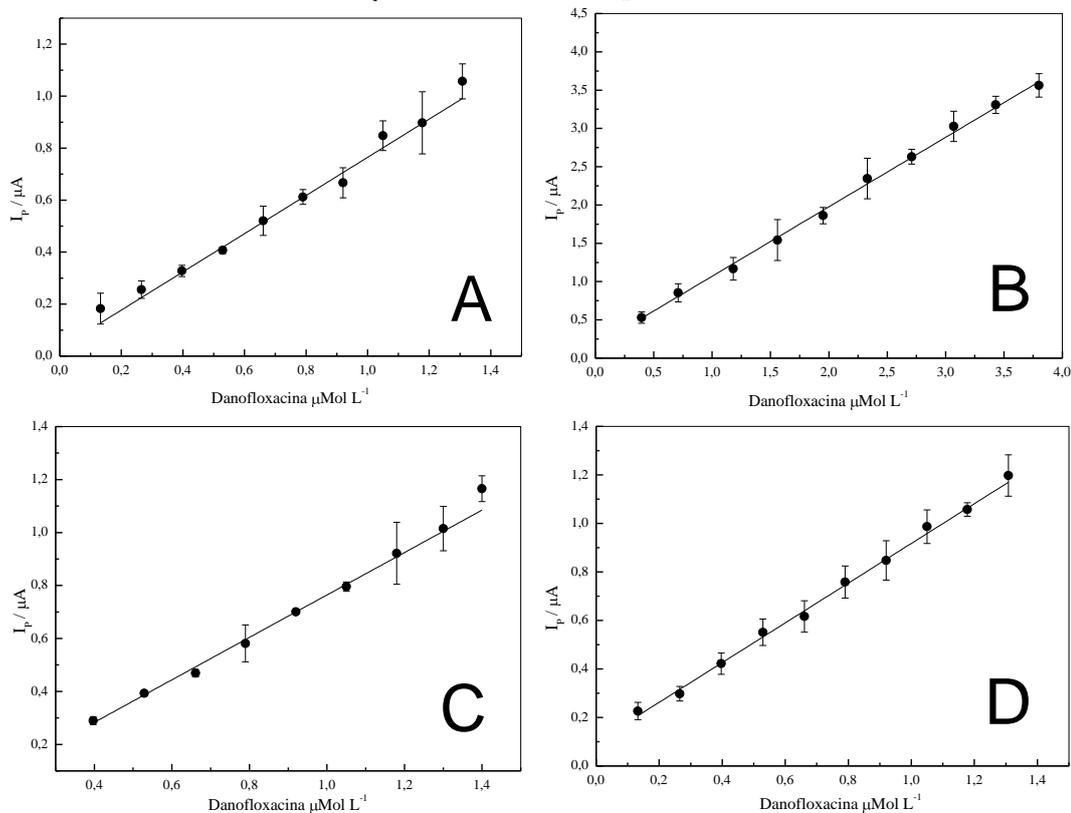


Tabela 13: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas obtidos na determinação de danofloxacina empregando VOQ em EPCM.

Parâmetros	ECV	EPC	EPCM-HSuc	EPCM-ZnSuc	EPCM-FeSuc
Eq. da curva	$j_p = 0,05357 + 0,08264x$	$I_p = 0,0303 + 0,73435x$	$I_p = 0,16273 + 0,9069x$	$I_p = -0,0367 + 0,801x$	$I_p = 0,0987 + 0,81885x$
r	0,998	0,991	0,999	0,998	0,997
LD (mol L ⁻¹)	$2,47 \times 10^{-6}$	$8,12 \times 10^{-8}$	$9,02 \times 10^{-8}$	$5,75 \times 10^{-8}$	$3,75 \times 10^{-8}$
LQ (mol L ⁻¹)	$8,26 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-7}$	$2,97 \times 10^{-7}$	$1,89 \times 10^{-7}$	$1,24 \times 10^{-7}$

Através da análise desta tabela temos que o ECV apresenta baixo limite de detecção e quantificação, quando comparado aos EPC, e que os EPCM modificados com os complexos metálicos de succinatos apresentaram melhores resultados de LD e LQ o que representa melhora na sensibilidade, o próximo passo é avaliar se essa melhora se mantém quando determinamos a danofloxacina em meio de urina bovina e suína.

4.5.1. Determinação da danofloxacina em urina bovina com EPC e EPCM

Nas seguintes figuras estão apresentadas as curvas de adição de padrão realizadas com amostras de urina bovina fortificadas com o padrão danofloxacina. A amostra de urina fortificada com a danofloxacina foi adicionada na célula eletroquímica de forma que a concentração na célula se encaixe dentro da faixa de linearidade da curva de calibração.

Figura 29: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPC. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.

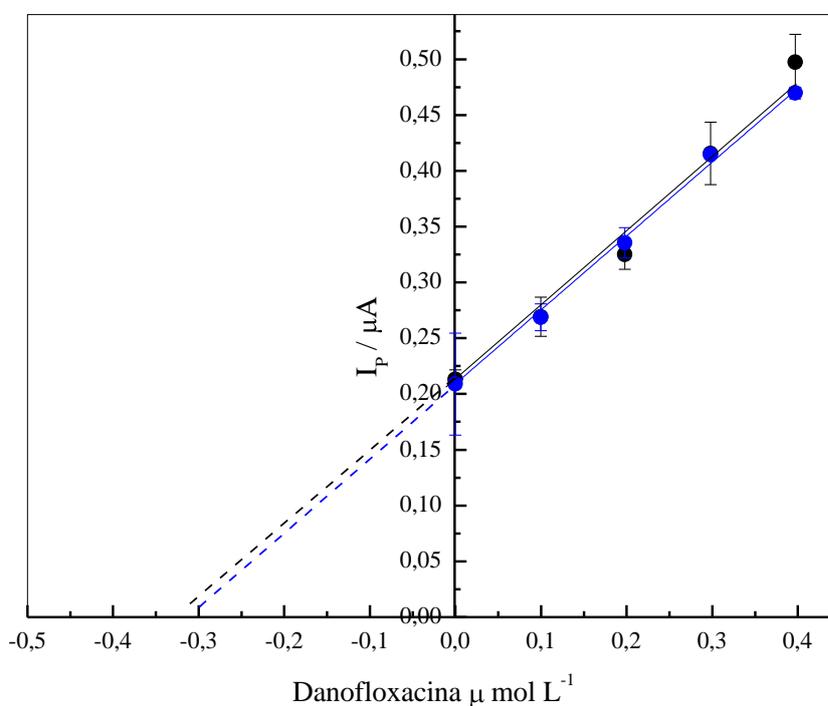


Figura 30: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-HSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.

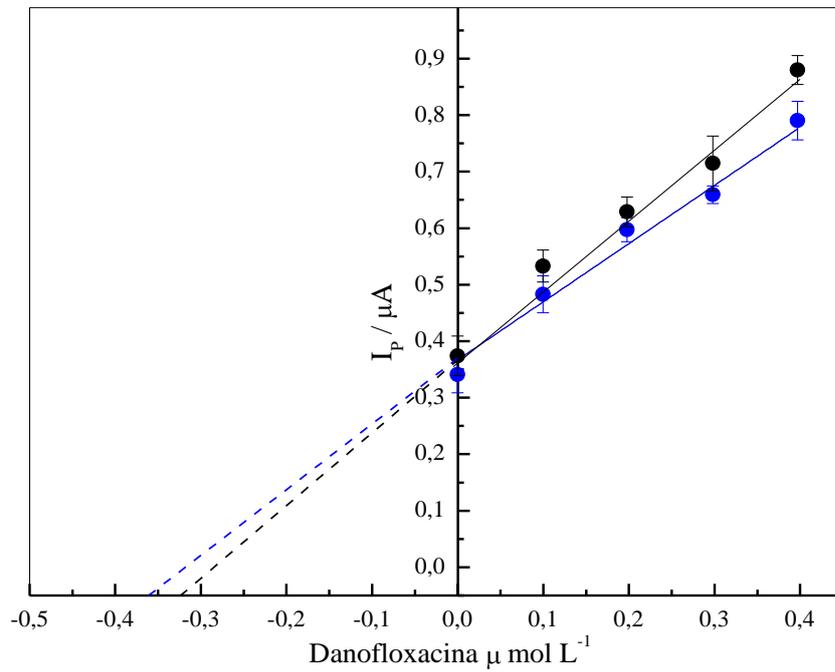


Figura 31: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-ZnSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.

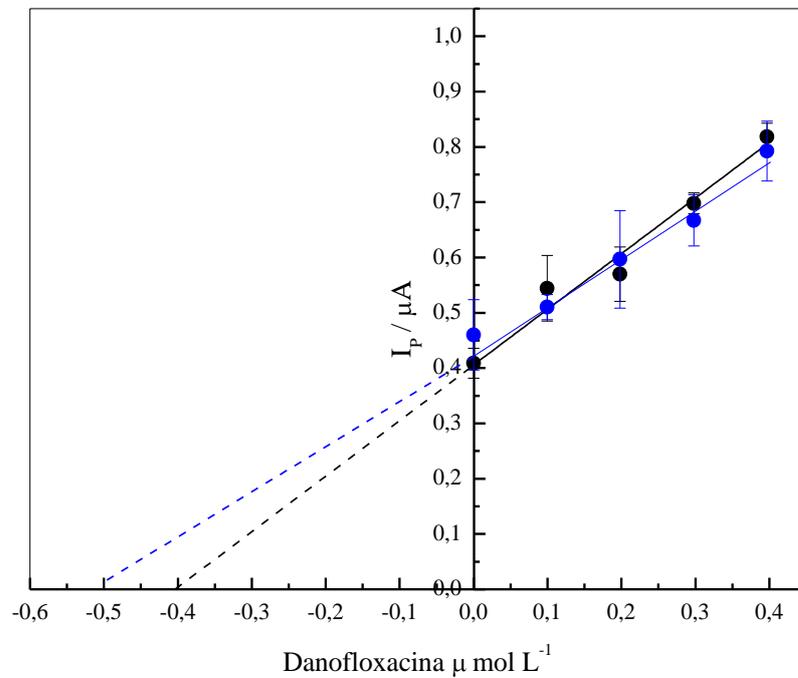
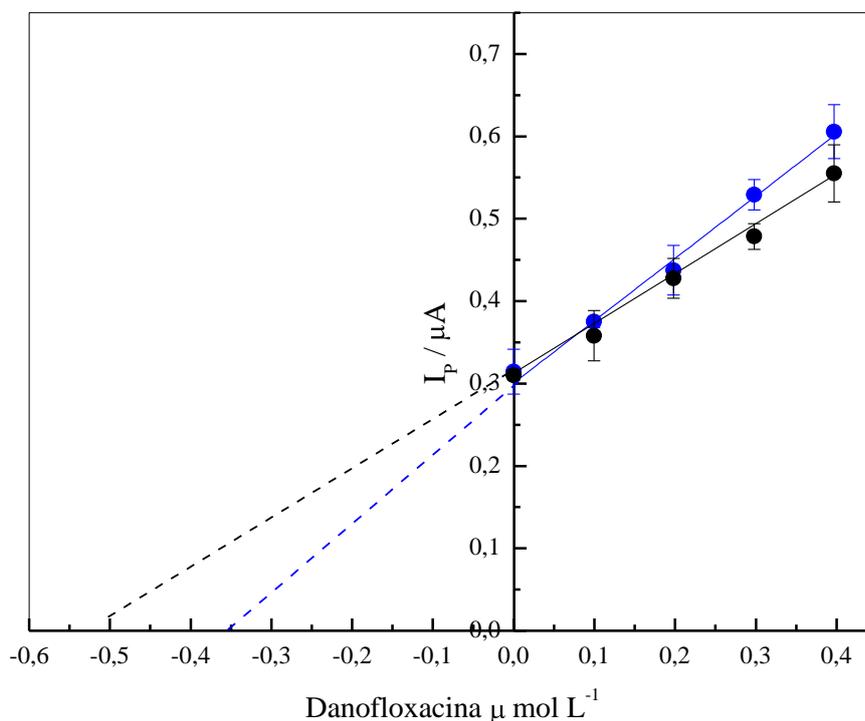


Figura 32: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina bovina para EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV. Intervalo de potencial: 0,2 a 1,4 V vs. ECS.



Na tabela seguinte estão apresentadas as recuperações obtidas para cada EPCM.

Tabela 14: Resultados de recuperação para Danofloxacina em amostra de urina bovina obtidos por voltametria de onda quadrada sobre EPC e EPCM.

[DANOFLOXACINA] $\mu\text{mol L}^{-1}$				
	Amostra	Adicionada	Encontrada	Rec. (%)
EPC	1	0,525	0,316	60,19
	2	0,525	0,332	63,24
	Média	0,525	$0,324 \pm 0,11$	61,71
EPCM-HSuc	1	0,525	0,356	67,81
	2	0,525	0,320	60,95
	Média	0,525	$0,338 \pm 0,25$	64,38
EPCM-ZnSuc	1	0,525	0,403	76,76
	2	0,525	0,500	95,23
	Média	0,525	$0,452 \pm 0,68$	85,99
EPCM-FeSuc	1	0,525	0,397	75,61
	2	0,525	0,533	101,52
	Média	0,525	$0,465 \pm 0,96$	88,57

As duas pastas modificadas com os complexos ZnSuc e FeSuc apresentaram significativa melhora para a detecção da danofloxacina em meio de urina bovina,

aproximadamente 20% de melhora com relação a pasta de carbono sem modificador, o EPCM-HSuc apresentou uma pequena melhora na sensibilidade com relação ao EPC. Através desse estudo consegue-se mostrar que o EPC apresenta resultados melhores dos que o descrito para o ECV, já que consegue atingir uma detecção na ordem de 10^{-7} mol L⁻¹.

4.5.2. Determinação da danofloxacina em urina suína com EPC e EPCM

Nas seguintes figuras estão apresentadas as curvas de adição de padrão realizadas com amostras de urina suína fortificadas com danofloxacina. A amostra de urina fortificada com a danofloxacina foi adicionada na célula eletroquímica de forma que a concentração na célula se encaixe dentro da faixa de linearidade da curva de calibração.

Figura 33: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPC. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.

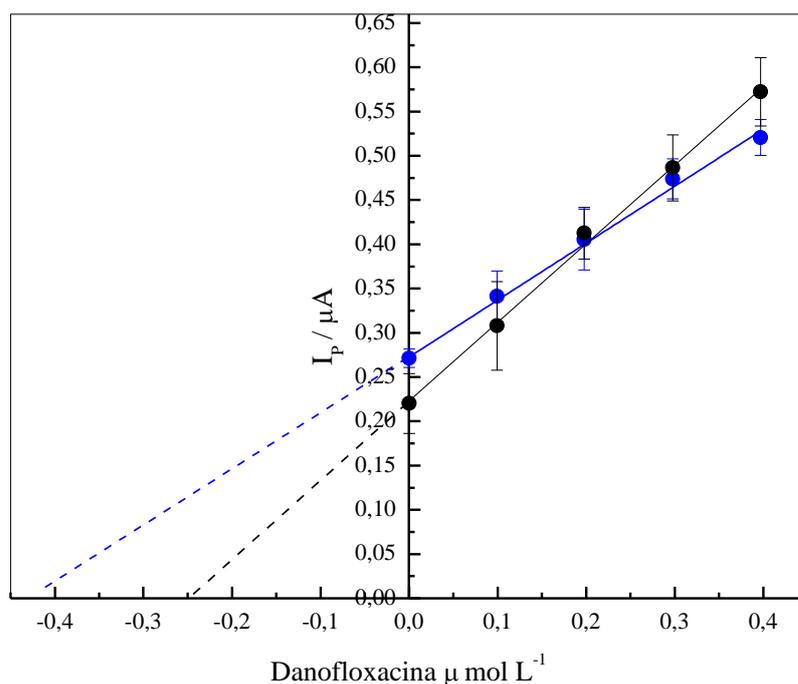


Figura 34: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-HSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.

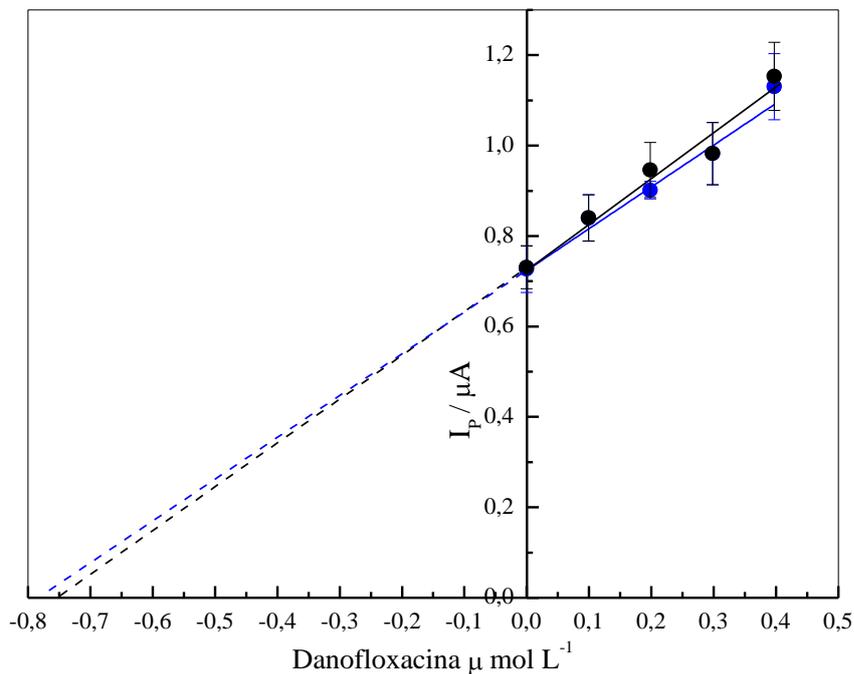


Figura 35: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-ZnSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.

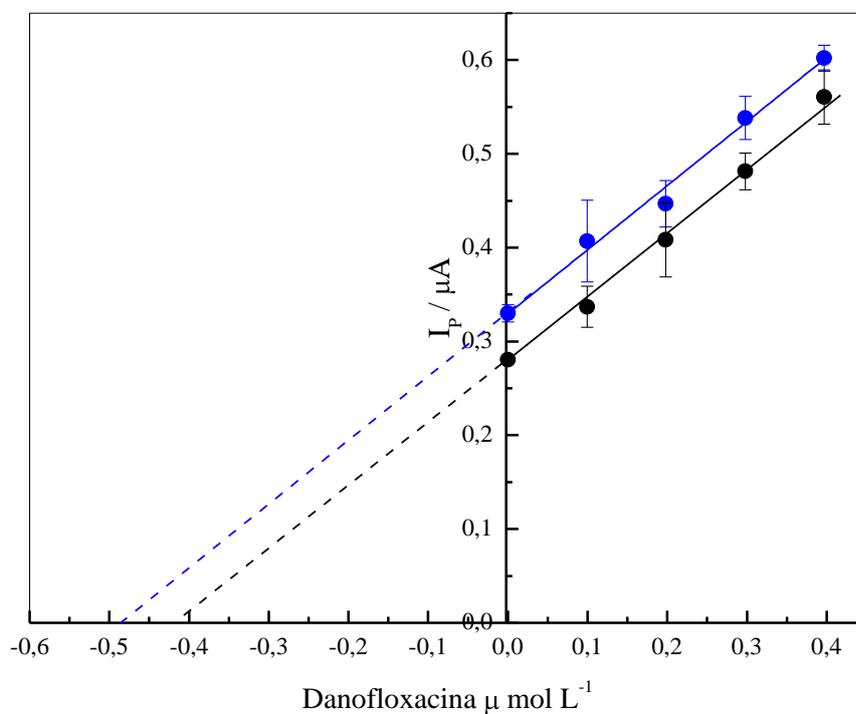


Figura 36: Curva de adição de padrão para determinação de DANO em amostras de urina suína para EPCM-FeSuc. BR pH 5,0 com $t_{eq} = 10$ s, $f = 20$ Hz, $a = 10$ mV e $\Delta E_s = 8$ mV.

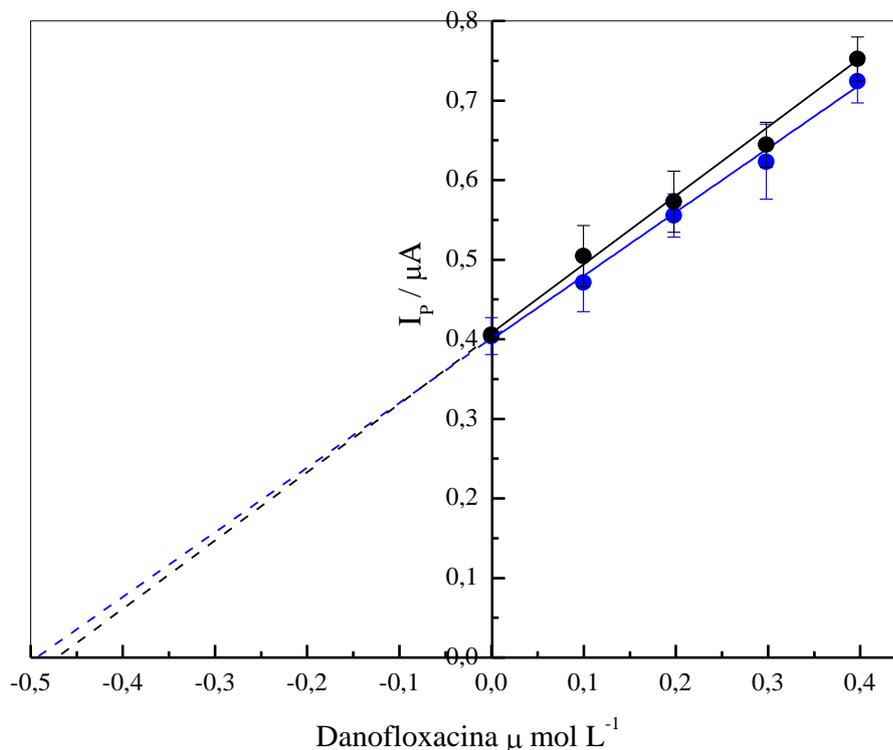


Tabela 15: Resultados de recuperação para Danofloxacina em amostra de urina suína obtidos por voltametria de onda quadrada sobre EPC e EPCM.

[DANOFLOXACINA] $\mu\text{mol L}^{-1}$				
	Amostra	Adicionada	Encontrada	Rec. (%)
EPC	1	0,44	0,252	57,27
	2	0,44	0,423	97,04
	Média	0,44	$0,337 \pm 1,21$	76,70
EPCM-HSuc	1	0,88	0,743	84,43
	2	0,88	0,783	88,97
	Média	0,88	$0,763 \pm 0,28$	86,70
EPCM-ZnSuc	1	0,44	0,412	93,63
	2	0,44	0,482	109,54
	Média	0,44	$0,447 \pm 0,49$	101,59
EPCM-FeSuc	1	0,44	0,498	113,18
	2	0,44	0,476	108,18
	Média	0,44	$0,487 \pm 0,15$	110,68

Os EPCM que apresentaram melhores resultados foram EPCM-FeSuc com recuperação média de 110,68 % e EPCM-ZnSuc com recuperação média de 101,59%, obtendo melhora de aproximadamente 25 % para EPC, o EPCM-HSuc apresentou melhora de 10% com relação ao eletrodo que não faz uso do modificador.

4.6. Determinação da danofloxacin por espectrofotometria de UV/VIS

A determinação analítica de DANO por UV/VIS foi realizado como comparação à técnica eletroquímica proposta. A curva analítica obtida por espectrofotometria de UV/VIS é apresentada na figura seguinte, o maior pico de absorção se deu em comprimento de onda (λ) 279 nm sendo este o valor de absorção medido para a construção da curva analítica.

Figura 37: Curva de calibração obtida pelo aumento do pico de absorção da danofloxacin em $\lambda = 279$ nm.

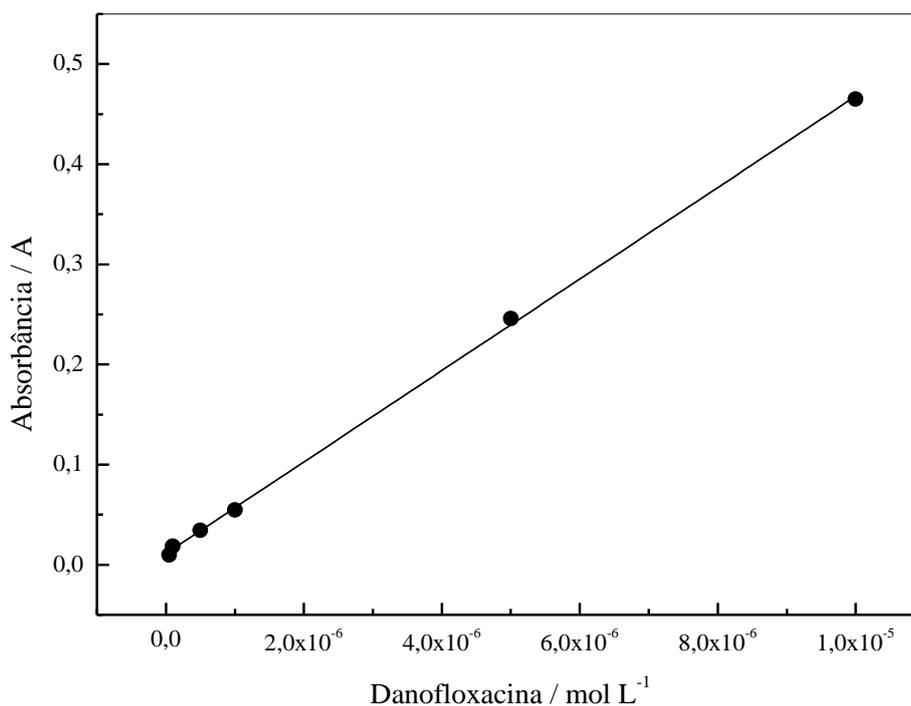


Tabela 16: Parâmetros obtidos da curva analítica obtida por espectrofotometria de UV/VIS na detecção da danofloxacin.

Parâmetros	Valores encontrados
Faixa de linearidade (mol L ⁻¹)	1x10 ⁻⁸ a 1x10 ⁻⁵
Equação da curva	$\Delta A = 0,01124 + 45678,51 [\text{dano}]$
r	0,99977
LD (mol L ⁻¹)	1,46 x 10 ⁻⁷
LQ (mol L ⁻¹)	4,83 x 10 ⁻⁷

Apartir dos resultados obtidos determinou-se a danofloxacin em meio de urina bovina e suína, além de testar a composição do medicamento de uso veterinário Advocin® 2,5 %.

4.5.1. Determinação da danofloxacin em urina bovina

A danofloxacin em meio de urina bovina foi determinada pelo método de adição de padrão, sendo a curva analítica obtida apresentada abaixo e os resultados obtidos apresentados na tabela seguinte.

Figura 38: Curva de adição de padrão construída pra determinação da danofloxacin em meio de urina bovina, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/VIS.

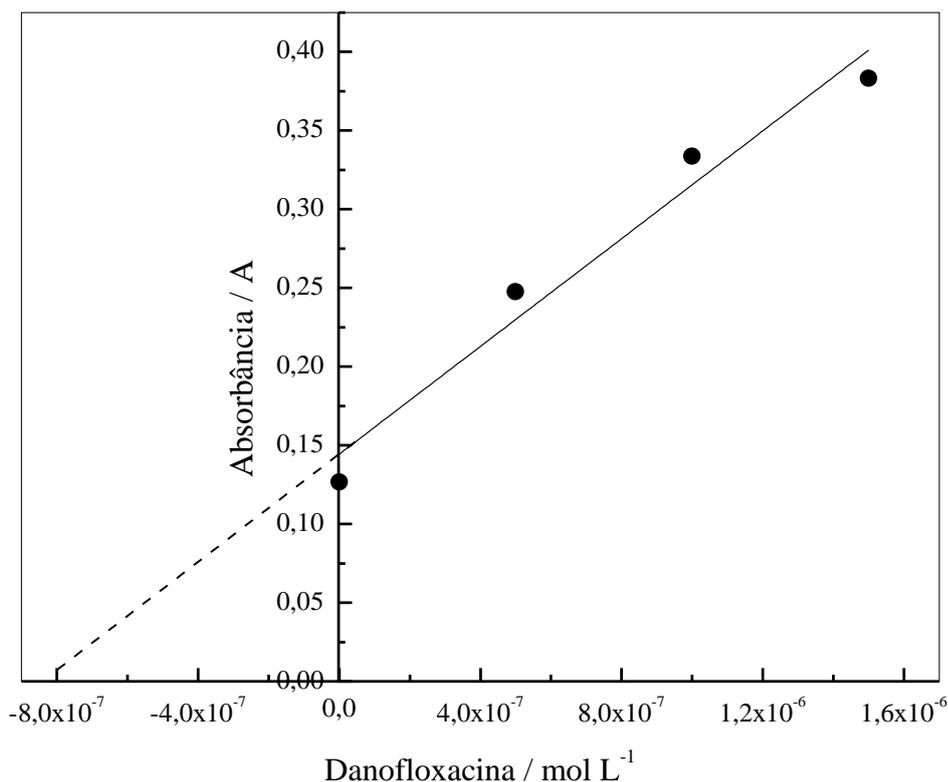


Tabela 17: Recuperação obtida para amostra de urina bovina fortificada com danofloxacin.

Amostra	[Danofloxacin] 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹		Rec. (%)
	adicionada	encontrada	
1	3,15	8,42	267,58

Na análise em meio de urina bovina apresentou uma elevada recuperação da danofloxacin, que pode ser explicada por erros de leitura do equipamento, já que o meio de urina pode ser considerada uma matriz complexa, estando assim mais vulnerável a erros associados a composição da matriz.

4.5.2. Determinação da danofloxacin em urina suína

A danofloxacin em meio de urina suína foi determinada pelo método de adição de padrão, sendo a curva analítica obtida apresentada abaixo e os resultados obtidos apresentados na tabela seguinte.

Figura 39: Curva de adição de padrão construída pra determinação da danofloxacin em meio de urina suína, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/Vis.

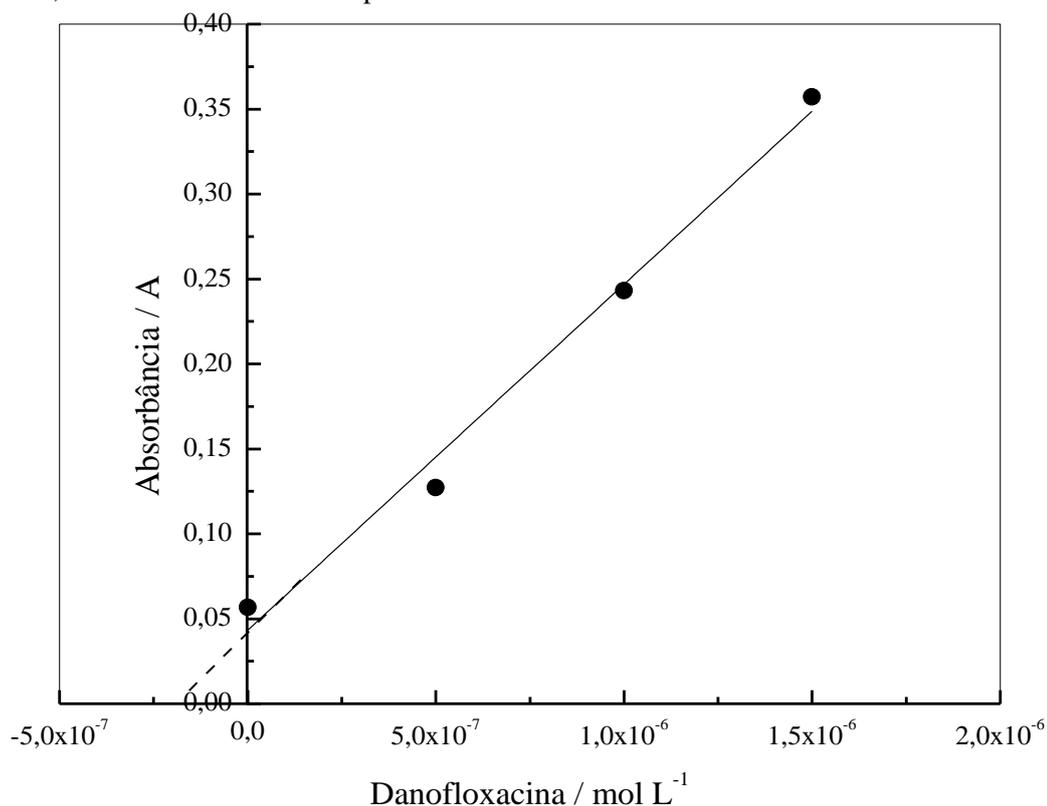


Tabela 18: Recuperação obtida para amostra de urina suína fortificada com danofloxacin.

Amostra	[danofloxacin] 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹		Rec. (%)
	adicionada	encontrada	
1	2,64	2,13	80,68

A determinação da danofloxacin em meio de urina suína apresentou baixa recuperação, o que ressalta que a técnica de VOQ aqui desenvolvida apresenta melhores valores de recuperação, mas que os apresentados em UV/Vis estão dentro dos intervalos de recuperação aceitos para a concentração do analito em estudo.

4.5.3. Determinação do medicamento Advocin® 2,5%

A fim de comparar os resultados obtidos em VOQ, analisou-se a quantidade de danofloxacina presente no fármaco Advocin® 2,5%, o resultado obtido é apresentado a seguir.

Figura 40: Curva de adição de padrão construída para determinação da danofloxacina no fármaco Advocin 2,5%, utilizando a técnica de espectrofotometria de UV/VIS.

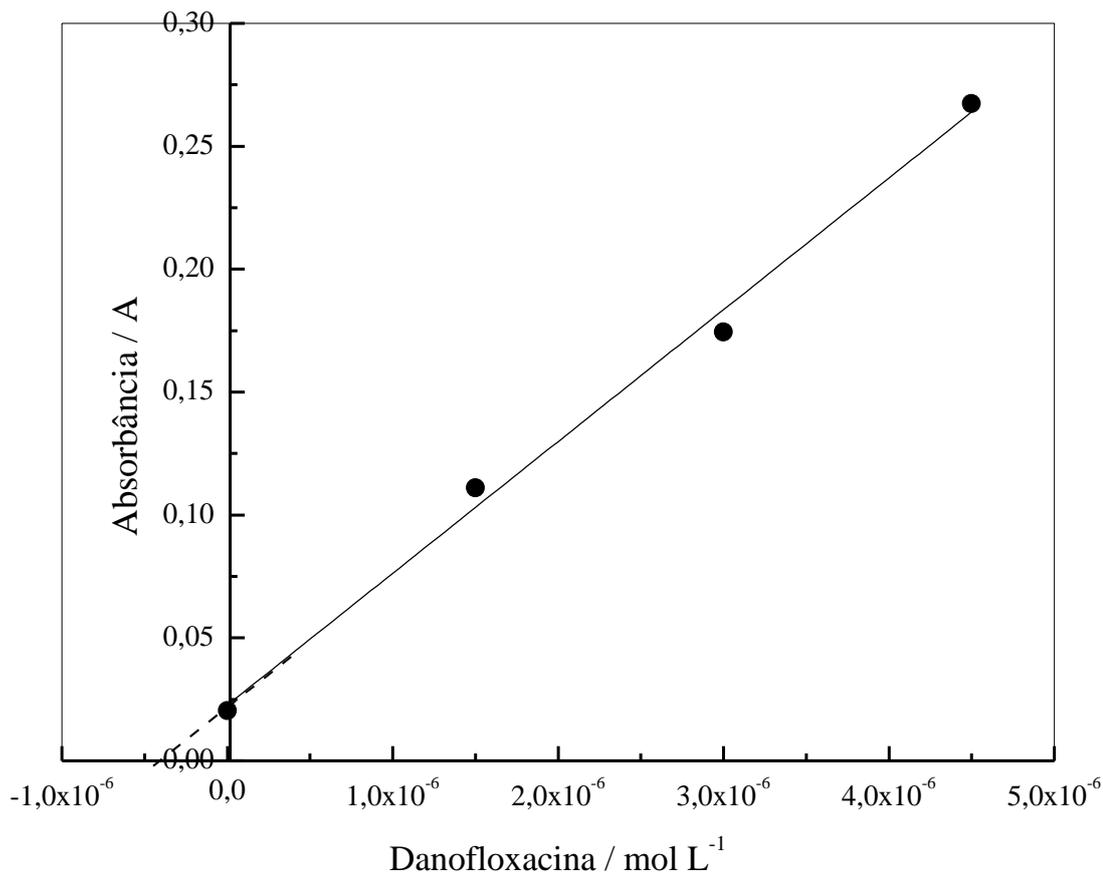


Tabela 19: Quantidade do fármaco encontrado pelo método de espectroscopia de UV/VIS.

Amostra	[Advocin®] 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹		Enc. (%)
	Rotulada	Encontrada	
1	1,0	4,22	422%

Na determinação da formulação farmacêutica tanto para VOQ quanto para UV/Vis apresentaram resultados nada satisfatórios, pois em ambas as análises apresentaram valores elevados na concentração da danofloxacina, o que provavelmente não é o correto devido ao controle de qualidade do laboratório que desenvolve o medicamento, a explicação para os

valores obtidos deve-se aos excipientes contidos na solução do medicamento e ser comercializado na forma de mesilato de danofloxacin, que intensificam o sinal e que mascara a verdadeira concentração de danofloxacin na formulação farmacéutica do Advocin® 2,5%.

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 ECV foram obtidos em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 5,0, concentração de 4,0 µmol L⁻¹ do surfactante Lauril sulfato de sódio, com frequência da onda quadrada de 20 Hz, amplitude de 20 mV, incremento de potencial de 8 mV. Para o estudo com EPC e EPCM, as melhores condições encontradas foram obtidos em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 5,0, concentração de 4,0 µmol L⁻¹ do surfactante Lauril sulfato de sódio, com frequência da onda quadrada de 20 Hz, amplitude de 10 mV, incremento de potencial de 8 mV. A danofloxacin nessas condições apresentou 2 picos de oxidação, sendo utilizado o mais intenso em 0,98 V vs. Ag/AgCl, com característica de processo irreversível.

O limite de detecção obtido com o ECV foi de 2,47 µ mol L⁻¹, para os EPC os LDs obtidos foram de 0,0812 µ mol L⁻¹ para EPC, 0,0902 µ mol L⁻¹ para EPCM-HSuc, 0,0575 µ mol L⁻¹ para EPCM-ZnSuc e 0,0375 µ mol L⁻¹ para EPCM-FeSuc.

As amostras de urina que apresentaram melhores valores de recuperação foram as analisadas com eletrodos de pasta de carbono modificadas com os complexos de FeSuc e ZnSuc, para detecção em meio de urina bovina o EPCM-FeSuc foi melhor com relação os demais EPC, para detecção da danofloxacin em meio de urina suína o EPCM-ZnSuc foi o melhor encontrado, com valores de recuperações de 88,57 % e 101,59 % respectivamente. Além disso, os possíveis interferentes presentes na urina não tiveram relevancia, pois apresentaram picos de oxidação em potencial diferente da danofloxacin.

Também foi feito um estudo com uma técnica comparativa, no caso UV/VIS, onde se obteve LD e LQ melhores que os obtidos pela técnica de VOQ com o ECV, já quando se refere ao uso de EPCM os resultados foram melhores que o obtido pela técnica espectrofotométrica. Na determinação do fármaco em meio de urina o método UV/VIS apresenta menor tolerância ao efeito de matriz.

CAPITULO 6 - REFERÊNCIAS

- [1] SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas X resistência Bacteriana na Medicina Veterinária.. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363–369, 2010.
- [2] BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of ophthalmology**, v. 49 Suppl 2, n. March, p. S73–8, 2004.
- [3] APPELBAUM, P. C; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000.
- [4] MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 172, n. 1, p. 10–28, 2006.
- [5] SALVADOR, A. J. de L. M. **Efeito do substituinte “-F” nas propriedades electrónicas e estruturais das fluoroquinolonas de 3^a e 4^a gerações**. Universidade Fernando Pessoa - [S.l.]. 2012.
- [6] BAMBEKE, F. VAN; MICHOT, J. M.; ELDERE, J. VAN; TULKENS, P.M M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 256–80, , 2005.
- [7] BAKKEN, J. S. The fluoroquinolones: How long will their utility last? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. 85–92, doi:10.1080/00365540410019039, 2004.
- [8] BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 1027–51, 2009.
- [9] MESTORINO, N.; MARCHETTI, M. L.; TURIC, E. PESSOA, J.; ERRECALDE, J. Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. **Analytica chimica acta**, v. 637, n. 1-2, p. 33–9, 2009.
- [10] CRUZ, A. D.; BATISTA, G. C. M.; MODOLO, J. R.; GOTTSCHALK, A. F.; LOPES, C. A. M. Atividade in vitro do danofloxacin e de sete drogas antimicrobianas frente a linhagens de Staphylococcus aureus isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 369–373, 1998.
- [11] MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JR. J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de Staphylococcus spp . isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

- [12] HUEBSCHLE, O. J. B.; AYLING, R. D.; GODINHO, K.; LUKHELE, O. TJIPURAZAIRE, G. ROWAN, T. G.; NICHOLAS, R. A. J.; Danofloxacin (Advocin) reduces the spread of contagious bovine pleuropneumonia to healthy in-contact cattle. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 3, p. 304–9, 2006.
- [13] PHARMACOPEIAL CONVENTION, T. U. S. FLUOROQUINOLONONES (Veterinary — Systemic). In: **The United States Pharmacopeial Convention**. 2007.
- [14] BILA, D. M. e DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.
- [15] EL-SHAL, M. A. Validated Electrochemical Methods for the Determination of Antibacterial Veterinary drug Danofloxacin in bulk form and formulation . **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 1, p. 280–284, 2012.
- [16] RODRÍGUEZ CÁCERES, M. I.; CABANILLAS, A. G.; DÍAZ, T. G.; CAÑAS, M. A. M. Simultaneous determination of quinolones for veterinary use by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 3-4, p. 398–402, 2010.
- [17] GALARINI, R.; FIORINI, L.; ANGELUCCI, F.; TOVO, G. R.; CRISTOFANI, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 46, p. 8158–64, 2009.
- [18] HOOFF, N. VAN; WASCH, K. D.; OKERMAN, L.; REYBROECK, W. POELMANS, S.; NOPPE, H.; BRABANDER, H. D. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1-2, p. 265–272, 2005.
- [19] JIANG, H.; ADAMS, C. D.; KOFFSKEY, W. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, n. 2, p. 219–226, 2005.
- [20] TRINDADE, M. A. G.; SILVA, G. M. DA; SOUZA, F. V. Determination of moxifloxacin in tablets and human urine by square-wave adsorptive voltammetry. **Microchemical Journal**, v. 81, n. 2, p. 209–216, 2005.
- [21] GOYAL, R. N.; RANA, A. R. S.; CHASTA, H. Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 83, p. 46–51, 2012.
- [22] USLU, B.; TOPAL, B. D.; OZKAN, S. A. Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1191–200, 2008.
- [23] RADI, A.; EL-SHERIF, Z. Determination of levofloxacin in human urine by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 58, n. 2, p. 319–24, 2002.

- [24] AL-GHAMDI, A. F. A study of adsorptive stripping voltammetric behavior of ofloxacin antibiotic in the presence of Fe(III) and its determination in tablets and biological fluids. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, n. 3, p. 235–241, 2009.
- [25] ENSAIFI, A. A.; KHAYAMIAN, T.; TAEI, M. Determination of ultra trace amount of enrofloxacin by adsorptive cathodic stripping voltammetry using copper(II) as an intermediate. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 942–8, 2009.
- [26] TEMERK, Y. M.; KAMAL, M. M.; IBRAHIM, M. S.; ALHAGRI, I. A. Voltammetric Studies for Analytical Determination of Antibacterial Danofloxacin and Orbifloxacin. **Eurasian Journal Alanalytical Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 53–65, 2009.
- [27] SOUZA, D. De; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- [28] GARCIA, A. F.; ROLLEMBERG, M. do C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592–1596, 2007.
- [29] DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A.; USLU, B. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v. 3, p. 56–73, 2010.
- [30] CRESPILO, F. N. e REZENDE, M. O. O. Eletrodos de Pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964–969, 2004.
- [31] COSTA, D. J. E. **Metomil: Investigação Eletroquímica e Desenvolvimento de Metodologias Voltamétricas usando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**. Universidade Federal da Paraíba - [S.l.]. 2013.
- [32] SOUZA, D. De.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. segunda Parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.
- [33] ATTA, N. F.; GALAL, A.; ABU-ATTIA, F. M.; AZAB, S. M. Characterization and electrochemical investigations of micellar/drug interactions. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2510–2517, 2011.
- [34] ATTA, N. F.; DARWISH, S. A.; KHALIL, S. E.; GALAL, A. Effect of surfactants on the voltammetric response and determination of an antihypertensive drug. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1438–45, 2007.
- [35] NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- [36] MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

- [37] NEZAMZADEH-EJHIEH, A.; BADRI, A. Application of surfactant modified zeolite membrane electrode towards potentiometric determination of perchlorate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, n. 1, p. 71–79, 2011.
- [38] WANG, X.-G.; WU, Q.-S.; LIU, W.-Z.; DING, Y.-P. Simultaneous determination of dinitrophenol isomers with electrochemical method enhanced by surfactant and their mechanisms research. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 589–594, 2006.
- [39] JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu (II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1673–1676, 2007.
- [40] OSLON, C.; ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. **Analytica chimica acta**, v. 22, p. 582–589, 1960.
- [41] AMIRI, M.; PAKDEL, Z.; BEZAATPOUR, A.; SHAHROKHIAN, S. Electrocatalytic determination of sumatriptan on the surface of carbon-paste electrode modified with a composite of cobalt/Schiff-base complex and carbon nanotube. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 81, n. 2, p. 81–5, 2011.
- [42] NIU, X.; YANG, W.; WANG, G.; REN, J.; GUO, H.; GAO, J. A novel electrochemical sensor of bisphenol A based on stacked graphene nanofibers/gold nanoparticles composite modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 98, p. 167–175, 2013.
- [43] FERREIRA, A. A. P.; RIBEIRO, S. J.; FUGIVARA, C. S.; CAIUT, J. M. A.; SARGENTELLI, V.; BENEDETTI, A. V. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade de contato sólido. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 183–204, 2011.
- [44] SINGH, B. K.; SINHA, N.; SINGH, N.; KUMAR, K.; GUPTA, M. K.; KUMAR, B. Structural, dielectric, optical and ferroelectric property of urea succinic acid crystals grown in aqueous solution containing maleic acid. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 71, n. 12, p. 1774–1779, 2010.
- [45] ANDRADE, F. D.; GONZALES, T.; ALEGRE, R. M.; DUARTE, E. L. Redes neurais artificiais aplicadas para o estudo da produção de ácido succínico via processo fermentativo. **Evidência**, v. 10, n. 1-2, p. 27–42, 2010.
- [46] AMIN, M. A.; EL-REHIM, S. S. A.; EL-SHERBINI, E. E. F.; BAYOUMY, R. S. The inhibition of low carbon steel corrosion in hydrochloric acid solutions by succinic acid. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 3588–3600, 2007.
- [47] CAIRES, F. J.; LIMA, L. S.; CARVALHO, C. T.; IONASHIRO, M. Thermal behaviour of succinic acid, sodium succinate and its compounds with some bivalent transition metal ions. **Thermochemica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 6–12, 2010.
- [48] WEISS, W. P. Factors affecting manure excretion by dairy cows. In: Cornell. **Nutrition Conference**. 2004.

- [49] IBIZUKA, M. M. Suínos: Novas Tecnologias. **Biotecnologia Científica e Desenvolvimento**, p. 16–17, 1997.
- [50] SILVA, J. M. e BRASIL, S. L. Critério de Avaliação da Corrosividade de Solos Baseado na Sobretensão de Hidrogenio. **Corrosão Proteção dos Materiais**, v. 28, n. 1, p. 19–25, 2010.
- [51] HOYER, B.; JENSEN, N. Stabilization of the voltammetric response of organic analytes with self-passivating electrode reactions: Synergistic effect of surfactants and high buffer strength. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, n. 1-2, p. 153–160, 2007.
- [52] GALLI, A.; SOUZA, D. De; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de Técnicas Eletroanalíticas na Determinação de Pesticidas em Alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.
- [53] LOVRIC, L.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; MURRAY, R. W. Effects in square-wave voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 33, n. 6, p. 739–744, 1988.
- [54] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- [55] HARRIS, D. C. **Quantitative Chemical Analysis**. eighth ed., 2010. p. 719